

**Aus dem Lehrstuhl
für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
des Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. H. Potschka

**Experimentelle Prüfung neuer Strategien
für die Therapie und Prophylaxe von
Epilepsien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

**im Fachgebiet
Pharmakologie**

**von
Christina Fuest
aus Essen**

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Koreferenten: Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Prof. Dr. Goldberg
Priv.-Doz. Dr. Fischer
Univ.-Prof. Dr. Heinritzi

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Gefördert durch den Doktorandenförderpreis 2007 der Bayer HealthCare AG und durch ein
Promotionsstipendium der FAZit-Stiftung

"once development was ended,
the founts of growth and regeneration of the axons and dendrites dried up irrevocably.
In the adult centers the nerve paths are something fixed, ended and immutable.
Everything must die, nothing may be regenerated.
It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree."

(Ramon y Cajal, 1928)

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	EPILEPSIEN.....	3
2.1.1	DEFINITION UND KLASSIFIZIERUNG	3
2.1.2	TIERMODELLE.....	5
2.2	ANFALLSINDUZIERT NEURONALE PLASTIZITÄT.....	9
2.2.1	EINFÜHRUNG.....	9
2.2.2	NEURODEGENERATION	9
2.2.3	NEUROGENESE	11
2.3	STRATEGIEN ZUR MODULATION ANFALLSINDUZierter VERÄNDERUNGEN	12
2.3.1	EINFÜHRUNG.....	12
2.3.2	MIMETISCHE PEPTIDE	13
2.4	PHARMAKORESISTENTE EPILEPSIEN.....	16
2.4.1	EINFÜHRUNG.....	16
2.4.2	MÖGLICHE URSACHEN.....	17
2.4.3	MULTIDRUG-TRANSPORTER-HYPOTHESE	17
2.5	STRATEGIEN ZUR ÜBERWINDUNG DER PHARMAKORESISTENZ.....	23
2.5.1	EINFÜHRUNG.....	23
2.5.2	RNA-INTERFERENZ	24
3	Zielsetzung und Arbeitshypothesen.....	29
4	Material und Methoden.....	31
4.1	MODULATION ANFALLSINDUZierter NEURONALER VERÄNDERUNGEN DURCH MIMETISCHE PEPTIDE.....	31
4.1.1	VERSUCHSTIERE	31
4.1.2	CHEMISCHES SE-MODELL	31
4.1.3	ELEKTRISCHES SE-MODELL.....	32
4.1.4	ANFALLSPARAMETER	35
4.1.5	MIMETISCHE PEPTIDE	35
4.1.6	HISTOLOGISCHE GEWEBEAUFBEREITUNG	36
4.1.7	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBMETHODEN.....	36
4.1.8	AUSWERTUNG UND STATISTIK	39
4.1.9	VERSUCHSDESIGN.....	43
4.2	MODIFIKATION DER PGP-EXPRESSION MITTELS RNA-INTERFERENZ	45
4.2.1	VERSUCHSTIERE	45
4.2.2	SIRNA	45

4.2.3	INTRAVENÖSE APPLIKATION DER siRNA	46
4.2.4	HISTOLOGISCHE GEWEBEAUFBEREITUNG	47
4.2.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBEMETHODEN.....	48
4.2.6	QUANTIFIZIERUNG DER PGP-EXPRESSION MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE	49
4.2.7	QUANTIFIZIERUNG DER PGP-EXPRESSION MITTELS POLYMERASEKETTENREAKTION.....	51
4.2.8	AUSWERTUNG UND STATISTIK	55
4.2.9	VERSUCHSDESIGN.....	55
5	Ergebnisse.....	57
5.1	MODULATION ANFALLSINDUZierter NEURONALER VERÄNDERUNGEN DURCH MIMETISCHE PEPTIDE.....	57
5.1.1	CHEMISCHES SE-MODELL	57
5.1.2	ELEKTRISCHES SE-MODELL.....	63
5.2	MODIFIKATION DER PGP-EXPRESSION MITTELS RNA-INTERFERENZ	69
5.2.1	ZWEITÄGIGE siRNA-BEHANDLUNG.....	69
5.2.2	VIERTÄGIGE siRNA-BEHANDLUNG	73
6	Diskussion	78
6.1	MODULATION ANFALLSINDUZierter NEURONALER VERÄNDERUNGEN DURCH MIMETISCHE PEPTIDE.....	78
6.1.1	MODULATION ANFALLSINDUZierter NEURONALER VERÄNDERUNGEN DURCH MIMETISCHE PEPTIDE: AUSWIRKUNGEN IM CHEMISCHEN SE-MODELL.....	78
6.1.2	MODULATION ANFALLSINDUZierter NEURONALER VERÄNDERUNGEN DURCH MIMETISCHE PEPTIDE: AUSWIRKUNGEN IM ELEKTRISCHEN SE-MODELL	83
6.2	MODIFIKATION DER PGP-EXPRESSION MITTELS RNA-INTERFERENZ	87
7	Zusammenfassung	94
8	Summary.....	97
9	Literaturverzeichnis.....	99
10	Anhang	120
10.1	GERÄTE.....	120
10.2	LÖSUNGEN UND SUBSTANZEN	121
	Publikationen	126
	Danksagung	128

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Binding-Cassette
AEDs	antiepileptic drugs (Antiepileptika)
Aqua dest.	Aqua destillata
ap	anterior posterior
BLA	basolaterale Amygdala
bp	Basenpaare
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CA	Cornu Ammonis (Ammonshorn)
ca.	zirka
cm	Zentimeter
contr	Kontrolle
COX	Cyclooxygenase
d	day (Tag)
DAB	3,3´Diaminobenzidin
DCX	Doublecortin
dv	dorsoventral
GD	Gyrus Dentatus
d.h.	das heißt
EEG	Elektroenzephalogramm
epb	Epobis
EPO	Erythropoetin
ept	Epotris
etc.	et cetera
Fa.	Firma
g	Gramm
h	hour (Stunde)
HRP	Horseraddish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
Hz	Hertz
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
lat	lateral
M	Molar
max.	maximal
mdr	multidrug resistance
MEZ	Mitteeuropäische Zeit
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mod.	modifiziert
MRPs	Multidrug-Resistance-Proteine
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
μA	Mikroampère
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NCAM	neural cell adhesion molecule (neuronales Zelladhäsionsmolekül)
NeuN	neural specific nuclear protein (neuronales Kernprotein)
Nr	Nummer
OD	optical density (Optische Dichte)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC	piriformer Cortex
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pgp	P-Glycoprotein
plan	Plannexin behandelt
PSA	polysialic acid (Polysialinsäure)
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA-Interferenz
s.c.	subkutan
sek	Sekunde
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SE	Status epilepticus
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SGZ	subgranuläre Zone
siRNA	small (short) interfering RNA
s.o.	siehe oben
sog.	so genanntes
SSSE	self sustained status epilepticus (selbsterhaltender Status epilepticus)
s.u.	siehe unten
SVZ	subventrikuläre Zone
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TLE	Temporallappenepilepsie
u.a.	unter anderem
veh	Vehikel
Wo	Woche
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Epilepsien sind charakterisiert durch das wiederholte, spontane Auftreten von Krämpfen zentralen Ursprungs. Sie sind die häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) bei Hund, Katze und Mensch. Bei einer Prävalenz von 1-2% sind in Deutschland ca. 800.000, weltweit ungefähr 50 Millionen Menschen betroffen. Die Mehrzahl der Epilepsien wird durch symptomatische Ursachen wie Schädelhirntraumen oder Schlaganfälle hervorgerufen. Diese initialen Insulte führen, über noch weitestgehend unbekannte Mechanismen, zur Generierung eines neuronalen Netzwerkes, dass die Entstehung von Epilepsien begünstigt (= proepileptogenes Netzwerk). Dieser Prozess wird auch als Epileptogenese (= Entstehungsprozess einer Epilepsie) bezeichnet. Verschiedenste neuropathologische Veränderungen wurden in den letzten Jahren mit der Epileptogenese in Verbindung gebracht. Hierzu zählen neben einer axonalen Reorganisation, morphologischen Veränderungen der neuronalen Dendriten und der Ausbildung hyperexzitabler Synapsen, vor allem eine gestörte Neubildung von Neuronen (= Neurogenese) und der Verlust von Neuronen (= Neurodegeneration). Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Mechanismen der Epileptogenese besser zu verstehen und potentielle Angriffspunkte für eine frühzeitige Beeinflussung der Epilepsieentstehung aufzudecken. In diesem Zusammenhang soll das therapeutische Potential sogenannter mimetischer Peptide und insbesondere deren Effekte auf anfallsassoziierte neuronale Veränderungen überprüft werden. Mimetische Peptide sind ausgewählte Fragmente komplexer Eiweiße, bei denen die Aminosäuresequenz auf einen aktiven Abschnitt reduziert wurde. Während spezifische Funktionen des Peptides erhalten bleiben, lassen sich unerwünschte Effekte auf diesem Wege ausschalten. Erste Studien ergaben, dass Abkömmlinge des neuronalen Zelladhäsionsmolekül (*neural cell adhesion molecule*, NCAM), sowie des Erythropoetins (EPO), dem wichtigsten natürlichen Wachstumshormon der Erythropoese, neuropathologische Veränderungen reduzieren können. Insbesondere für die Entwicklung prophylaktischer Behandlungsmöglichkeiten bedarf es einer Erweiterung des Wissenstandes über die an der Epilepsieentstehung beteiligten

Mechanismen. Gegenwärtig ist die bedeutsamste Therapieform von Epilepsien nach wie vor die pharmakologische Therapie mit dem Ziel der Anfallsverhinderung. Bei etwa einem Drittel der Epilepsiepatienten führt allerdings eine Therapie mit den verschiedensten Antiepileptika (*antiepileptic drugs*, AEDs) zu keiner zufriedenstellenden Kontrolle der Anfallsaktivität. Diese pharmakoresistente Form der Epilepsie geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Unterschiedliche Ursachen werden für das Auftreten von Pharmakoresistenzen diskutiert. Derzeit nimmt man an, dass eine Überexpression bestimmter Effluxtransporter, sogenannter Multidrug-Transporter, eine zentrale Bedeutung zukommt. Auf Grund eines erhöhten, aktiv auswärtsgerichteten Transports an der Blut-Hirn-Schranke können die therapeutisch eingesetzten AEDs ihre benötigte Wirkstoffkonzentration im Gehirnparenchym nicht erreichen. Eine Pharmakotherapie bleibt dadurch erfolglos. Eine Inhibition der pathologisch gestörten Expression der Multidrug-Transporter könnte hingegen die Aufnahme von AEDs in das Gehirn steigern. Daher stellt die experimentelle Prüfung neuer Strategien zur Therapie und Prophylaxe von transporterbasierten, pharmakoresistenten Epilepsien einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Es soll untersucht werden, ob sich der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) zur Inhibition der anfallsinduzierten Hochregulation des Multidrug-Transporters *P-Glycoprotein* (Pgp) eignet.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 EPILEPSIEN

2.1.1 Definition und Klassifizierung

Der Begriff *Epilepsie* bezeichnet eine Dysfunktion des Gehirns, die charakterisiert ist durch das rezidivierende, spontane Auftreten von Krämpfen zentralen Ursprungs. Hierbei handelt es sich um Unterbrechungen der normalen zerebralen Funktion, sogenannte epileptische Anfälle (FISHER et al. 2005). Ausgelöst werden diese Anfälle durch heftige synchronisierte neuronale Entladungen (SPERK 2006). Der Begriff Epilepsie steht für kein einheitliches Krankheitsbild, sondern umfasst eine Vielzahl von unterschiedlichen Syndromen und Symptomkomplexen als Ausdruck einer zerebralen Störung unterschiedlichster Genese (FRÖSCHER 1994). Epilepsien sind bei Tieren (v.a. Hund und Katze) und Menschen die häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen des ZNS (HAUSER 1999; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005). Bei einer Prävalenz von 1-2% sind in Deutschland ungefähr 800.000, weltweit etwa 50 Millionen Menschen im Laufe ihres Lebens von einer Epilepsieerkrankung betroffen (BROWNE u. HOLMES 2001). Bei Hund und Katze treten Epilepsien mit einer vergleichbaren Häufigkeit wie bei Menschen auf (LECOUTEUR u. CHILD 1989). Die bedeutungsvollste Behandlungsstrategie einer Epilepsieerkrankung ist die Pharmakotherapie. Diese ist maßgeblich von der Art des epileptischen Syndroms und den epileptischen Anfällen abhängig. Auf Grund dessen ist eine genaue Diagnose und Klassifizierung der Epilepsien eine Grundvoraussetzung für eine aussichtsreiche Therapie. Die Einteilung der epileptischen Syndrome und epileptischen Anfälle erfolgt nach den Merkmalen Anfallsmuster, Ursache, Alter bei Krankheitsbeginn, auslösende Faktoren und dem elektroenzephalographischen Befund.

Der Status epilepticus (SE) ist durch eine anhaltende Anfallsaktivität mit Bewusstseinsverlust oder Bewusstseinsstrübung charakterisiert (LOWENSTEIN et al. 1999) und wird von einem Gelegenheitsanfall und einer Anfallsserie unterschieden.

Beim Anfallsmuster differenziert man fokale (partielle) und generalisierte Anfälle (Abb. 1).

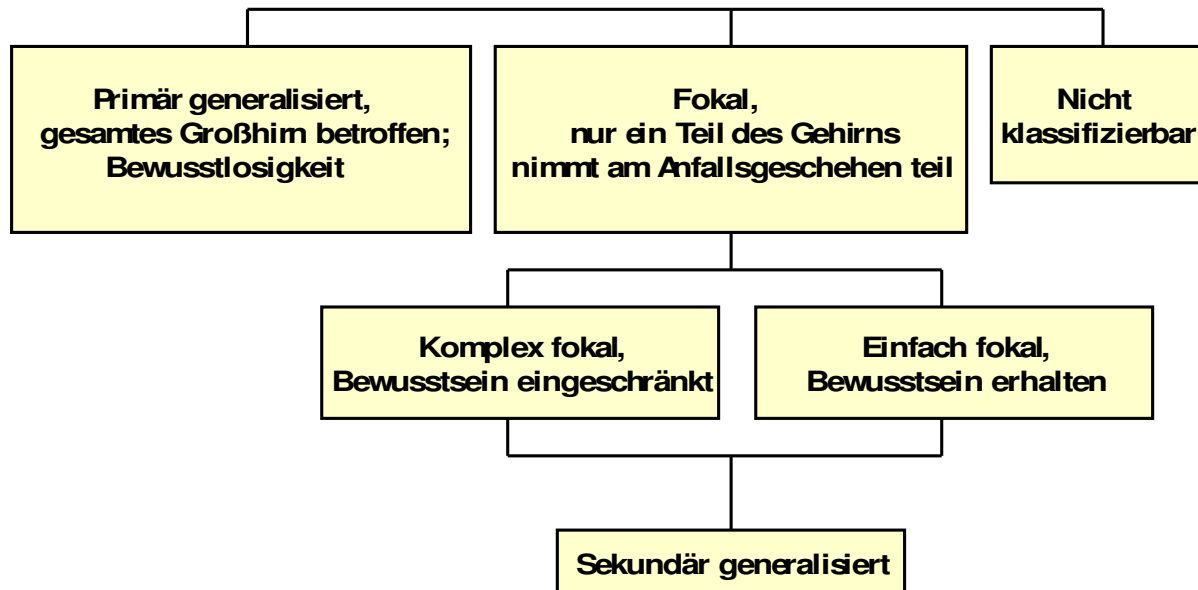


Abb. 1: Bezogen auf ihren Ursprung und ihrem Ausbreitungsmuster können generalisierte, fokale und nicht klassifizierbare Epilepsien unterschieden werden. Fokale Formen lassen sich in einfach und komplex fokale Epilepsien differenzieren und können sekundär generalisieren (mod. nach www.projekte.isb.bayern.de).

Fokale Anfälle sind lokalisationsbezogen. Es nimmt nur eine umschriebene Gehirnregion am Anfallsgeschehen teil. Ausdruck dieser Epilepsieform ist eine unwillkürliche Bewegung einzelner Muskelgruppen. Eine Differenzierung dieser Anfallsart erfolgt ferner in einfach-fokale (keine Bewusstseinsbeeinträchtigung) und komplex-fokale (mit Bewusstseinsbeeinträchtigung) Formen. Eine Ausweitung des Anfallsgeschehens über das gesamte Gehirn bezeichnet man als sekundär-generalisiert (FISHER et al. 2005). Von primär generalisierten Anfällen spricht man hingegen, wenn die epileptische Aktivität bereits von Anfangsbeginn an über beide Großhirnhemisphären ausgebreitet ist. Weiterhin erfolgt eine Unterteilung der primär und sekundär generalisierten Anfälle anhand des Vorhanden- oder Nichtvorhandenseins motorischer Funktionsstörungen in tonische (Streckkrämpfe), klonische (Ruderkrämpfe), tonisch-klonische, myoklonische (Muskelzuckungen ohne Bewegungseffekt) und atonische Krämpfe (Erschlaffung der Muskulatur) sowie Absencen (Bewusstseinsminderung mit anschließender Amnesie). Beim Menschen ist die Temporallappenepilepsie (TLE) mit Auftreten von komplex-fokalen Anfällen die häufigste Epilepsieform. Neben fokalen und generalisierten Epilepsien

unterscheidet man zusätzlich unklassifizierbare Epilepsien und weitere spezielle Syndrome. In der Veterinärmedizin erfolgt die Einteilung der verschiedenen epileptischen Syndrome und epileptischen Anfälle anhand der beschriebenen humanmedizinischen Klassifikation. Am häufigsten bei Hund und Katze zu beobachten sind generalisierte Anfälle mit einer klonisch-tonischen Krampfaktivität (DEWEY et al. 2004). Die weitere Unterteilung in symptomatische, idiopathische und kryptogene Epilepsien richtet sich nach der Ätiologie (FISHER et al. 2005).

Bei symptomatischen Epilepsien liegt der Epilepsieentstehung ein initialer Insult zu Grunde. Dies kann z.B. ein Schädelhirntrauma, ein Schlaganfall, eine Enzephalitis oder ein Gehirntumor sein. Über noch nicht detailliert bekannte Mechanismen können diese primären Insulte zur Generierung eines neuronalen Netzwerkes führen, das die Manifestation einer Epilepsie begünstigt. Dieser Prozess der Epilepsieentstehung wird auch als Epileptogenese bezeichnet. Symptomatische Epilepsien werden bei älteren Menschen als häufigste Epilepsieform diagnostiziert (PODELL et al. 1995). Idiopathische Epilepsien basieren auf einer genetischen Komponente und sind bei Hunden (BERENDT u. GRAM 1999; CHANDLER u. VOLK 2008) sowie bei Kindern und Jugendlichen bis zum Erreichen des 20. Lebensjahres die häufigste Ursache einer Epilepsie. Kryptogene Epilepsien sind vermutlich Ausdruck einer bis dato nicht identifizierten organischen Ursache.

2.1.2 Tiermodelle

Für die experimentelle Prüfung neuer pharmakologischer Strategien und Therapien sind geeignete Tiermodelle unentbehrlich. An ein Tiermodell einer Erkrankung werden drei grundlegende Ansprüche gestellt. So sollen sowohl die Symptomatik als auch die Pathogenese im Modell derjenigen der Erkrankung ähnlich und mit ihr vergleichbar sein. Zudem soll das Tiermodell hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit von Arzneimitteln prädiktive Aussagen erlauben. Bei Tiermodellen der Epilepsie können unterschiedliche Modelltypen differenziert werden (Abb. 2). Grundsätzlich können „akute“ Modelle, sogenannte Anfallsmodelle, von „chronischen“ Modellen zur Untersuchung der Epileptogenese unterschieden werden. Anfallsmodelle werden insbesondere zur Prüfung neu entwickelter Antiepileptika auf ihre antikonvulsive Wirkung eingesetzt. Zwei wichtige Modelle in diesem Zusammenhang sind der „Maximale-Elektroschock-Test“ und der „Pentylentetrazoltest“. Zur Untersuchung der Mechanismen der Epileptogenese können prinzipiell Tiermodelle mit induzierten und

spontan auftretenden Anfällen verwendet werden. Bei Modellen mit einer Induktion der Anfälle lassen sich diese entweder elektrisch oder chemisch auslösen. Dabei treten die Anfälle in diesen Modellen nur im Zusammenhang mit einer Anfallsinduktion auf. Anders hingegen ist die Situation bei Modellen mit spontan auftretenden Anfällen. Als Folge eines anfänglichen elektrischen oder chemischen Insultes entwickeln die Tiere dieser Modelle nach einer Latenzzeit spontan auftretende, wiederkehrende Anfälle. Ähnlich wie bei Epilepsiepatienten, die in der Folge eines initialen Insultes (Tumor, Schädelhirntrauma, SE) eine Epilepsie entwickeln, scheint es in diesen Modellen bei den Tieren zur Generierung eines prokonvulsiven neuronalen Netzwerkes zu kommen. Auf Grund dessen eignen sich diese Art von Modellen sehr gut zur Untersuchung der Epileptogenese. Sie spiegeln die klinische Realität symptomatisch bedingter Epilepsien wider. Die Mechanismen der Epilepsieentstehung lassen sich mittels genetischer Modelle z.B. epileptische Hunde (LÖSCHER 1997), chemischer Modelle z.B. Kainsäure (BEN-ARI et al. 1981) oder Pilocarpin (HONCHAR et al. 1983) und elektrischer Tiermodelle u.a. Kindling-Modell (GODDARD et al. 1969) und SE-basolaterale Amygdala (BLA)-Modell (BRANDT et al. 2003) untersuchen. Hervorzuheben sind das chemische Pilocarpin-Modell und das elektrische SE-BLA-Modell, die in dieser Arbeit verwendet wurden und im Folgenden näher erklärt werden.

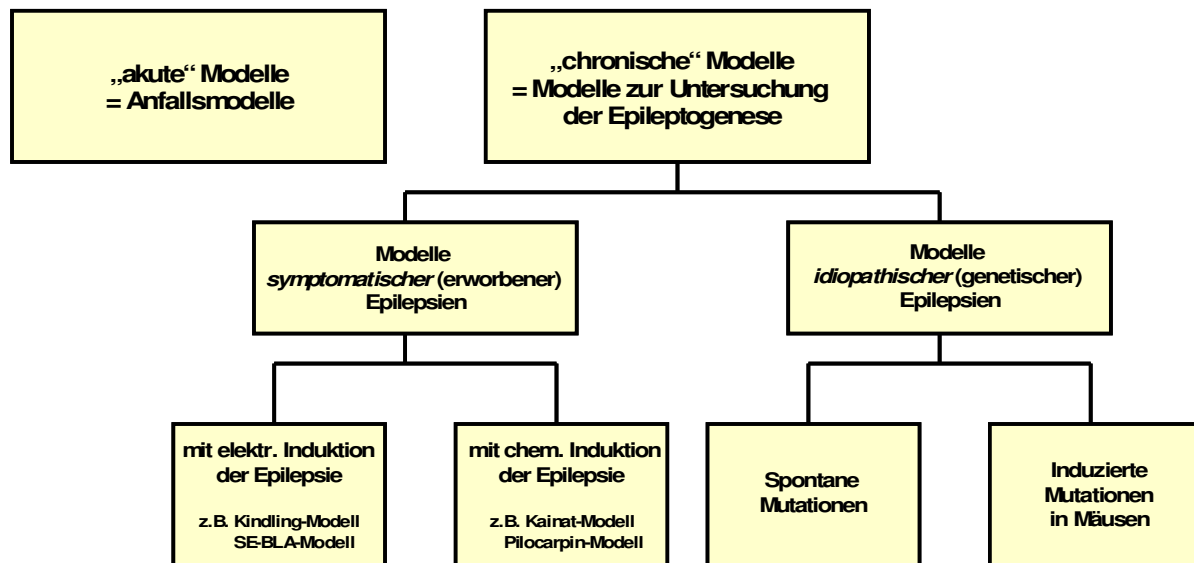


Abb. 2: Schematische Darstellung der Epilepsie-Tiermodelle. Grundsätzlich können akute (Anfalls-) Modelle von chronischen Modellen unterschieden werden. Chronische Modelle sind zur Untersuchung der Epileptogenese sehr gut geeignet. Eine Unterteilung der chronischen Modelle erfolgt in Modelle symptomatischer und idiopathischer Epilepsien.

Fraktioniertes Lithium-Pilocarpin-Modell

Durch systemische Applikation des direkt parasymphomimetisch wirksamen Alkaloids Pilocarpin kann ein SE induziert werden (HONCHAR et al. 1983; CAVALHEIRO et al. 1991). Über eine Aktivierung des cholinergen Systems im ZNS kommt es zur Auslösung der Anfälle. Die Applikation von Lithium 12-24h vor der Pilocarpinapplikation potenziert die Wirkung des Pilocarpins um ein Vielfaches und senkt so die benötigte Dosis zur Induktion einer effizienten Anfallsaktivität (HONCHAR et al. 1983; JOPE et al. 1986). Auf Grund einer sehr hohen Mortalitätsrate bei einmaliger Pilocarpingabe erfolgt die Pilocarpingabe fraktioniert (GLIEN et al. 2001). Bei dieser Modifizierung des ursprünglichen Pilocarpin-Lithium-Modells wird den Tieren Pilocarpin wiederholt, jede halbe Stunde, bis zum Erreichen eines SE appliziert. Die Dosis pro Injektion ist um ein Drittel niedriger als die bei einmaliger Applikation. Dieses Modell zeichnet sich weiterhin dadurch aus, dass es tierindividuelle Unterschiede berücksichtigt. So unterscheidet sich die Anzahl der

benötigten Injektionen bis zum Erreichen eines SE von Tier zu Tier. Die Anfälle treten als fokale bzw. komplex-fokale mit sekundärer Generalisierung auf und gehen in der Regel in einen SE über (TURSKEI et al. 1983). Die Anfallsaktivität führt zu einer starken Glutamatfreisetzung. Hierdurch hervorgerufene neurohistopathologische Veränderungen, insbesondere massive Neuronenverluste ähneln sehr den Befunden bei TLE-Patienten (TURSKEI et al. 1983; CLIFFORD et al. 1987). Elektrographische, pharmakologische und klinische Befunde sind ebenfalls vergleichbar mit denen bei der TLE (TURSKEI et al. 1983; CLIFFORD et al. 1987). Zusätzlich treten bei den Tieren nach Beendigung des SE und nach einer Latenzzeit von einigen Wochen spontane, wiederkehrende Anfälle auf (CAVALHEIRO et al. 1991).

SE-BLA-Modell

In diesem elektrischen Modell wird durch eine 25-minütige Dauerstimulation (700 μ A) der BLA ein sich selbst erhaltender SE (SSSE) bei den Tieren induziert (BRANDT et al. 2003). Dabei können drei verschiedene Arten eines SSSE (fokal, fokal mit einzelnen generalisierten Anfällen, generalisiert; siehe Kap. 4.1.3) auftreten. Die prozentuale Verteilung der verschiedenen SSSE-Typen variiert in Abhängigkeit von dem verwendeten Rattenstamm, dem Geschlecht der Tiere und der Lokalisation der Elektrode. Der Typ des SSSE beeinflusst entscheidend die prozentuale Wahrscheinlichkeit des späteren Auftretens spontaner epileptischer Anfälle. Nur 33% der Ratten mit einem fokalen SSSE entwickeln nachfolgend epileptische Anfälle, während dies bei mehr als 90% der Ratten mit einem SSSE Typ II oder III mit generalisierten Anfällen der Fall ist. Das spätere Auftreten spontaner Anfälle ist zudem wahrscheinlicher, wenn der generalisierte SSSE mindestens vier Stunden andauert und erst danach die Krampfaktivität mit Diazepam unterbrochen wird. Auftretende neurodegenerative Prozesse sind bei Tieren mit fokalem SSSE im Unterschied zu solchen mit einem generalisierten SSSE weniger ausgeprägt und zudem regional begrenzt. Neuropathologische Veränderungen bei Tieren mit einem generalisierten SSSE ähneln denen nach einem chemisch (Pilocarpin) induziertem SE (BRANDT et al. 2003).

2.2 ANFALLSINDUZIERTE NEURONALE PLASTIZITÄT

2.2.1 Einführung

Neuronale Plastizität ist die Grundlage für eine regelgerechte Entwicklung und Funktion des ZNS. Entgegen traditionellen neurowissenschaftlichen Annahmen zeigen zahlreiche Arbeiten der letzten Jahrzehnte, dass Plastizität sogar im adulten Gehirn stattfindet (GAGE 2002; MING u. SONG 2005; GOULD 2007). Demnach stellt die grundsätzliche Formbarkeit des menschlichen Gehirns im Normalfall ein lebenslanges Phänomen dar. Der Begriff der neuronalen Plastizität wird in vielerlei Hinsicht gebraucht. Die physiologische Plastizität beschreibt Veränderungen im Rahmen physiologischer Prozesse wie dem Lernen und der Gedächtnisbildung. Sie umfasst u.a. die Modulation der synaptischen Übertragung (synaptische Plastizität) und die Neubildung von Nervenzellen, besonders im Hippocampus (strukturelle Plastizität). Störungen der neuronalen Plastizität (pathologische Plastizität) sind über die letzten Jahre ein zunehmend wichtiges Erklärungsmodell zur Entstehung neurologischer Erkrankungen geworden. Diverse Publikationen konnten in unterschiedlichen Epilepsiemodellen wie auch in reseziertem Gehirngewebe von Epilepsiepatienten zeigen, dass es als Folge von epileptischen Anfällen zu Veränderungen der neuronalen Plastizität kommt (SLOVITER 1999; DALBY u. MODY 2001; DUDEK et al. 2002; PITKANEN 2002; PITKANEN u. SUTULA 2002). Diese können als neuropathologische Umgestaltungen im Rahmen der Entstehung eines epileptogenen, prokonvulsiven Netzwerkes gewertet werden, die schließlich in der Manifestation einer Epilepsie resultieren. In diesem Zusammenhang kommt es neben einer aberranten axonalen Reorganisation, morphologischen Veränderungen der neuronalen Dendriten, der Ausbildung hyperexzitabler Synapsen vor allem auch zu einer gestörten Neubildung von Neuronen (= Neurogenese) (PARENT et al. 1998b; SCOTT et al. 1998), andererseits aber auch zu einem erheblichen Verlust von Neuronen (= Neurodegeneration) infolge apoptotischer und nekrotischer Vorgänge (SLOVITER et al. 1996; VELISEK u. MOSHE 2003).

2.2.2 Neurodegeneration

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass es als Folge epileptischer Anfälle zu einem massiven Verlust von Neuronen durch apoptotische und nekrotische Mechanismen

kommt (FUJIKAWA et al. 2000b). Von dieser Degeneration besonders betroffen sind die Pyramidenzellschicht des Hippocampus und der Hilus des Gyrus Dentatus im Hippocampus. Innerhalb der Pyramidenzellschicht zeigen charakteristischerweise die CA₁-Region sowie die CA_{3b}- bzw. CA₄-Region (Abb. 3) eine starke Anfälligkeit gegenüber einer anfallsinduzierten Neurodegeneration, während die CA₂- und CA_{3a}-Region eher geschützt zu sein scheinen (SLOVITER 2005). Neben einer Neurodegeneration in hippocampalen Gehirnregionen wurde bei Epilepsiepatienten auch ein Verlust an Neuronen in der Amygdala, dem entorhinalen Cortex (YILMAZER-HANKE et al. 2000; SALMENPERA et al. 2001) sowie im piriformen Cortex (FUJIKAWA et al. 2000a) beobachtet. Zur Zeit geht man davon aus, dass der massive Verlust an Neuronen für eine Störung der hippocampalen Funktion mitverantwortlich ist und zudem weitere plastische Veränderungen bedingt (SLOVITER 1999; DUDEK et al. 2002).

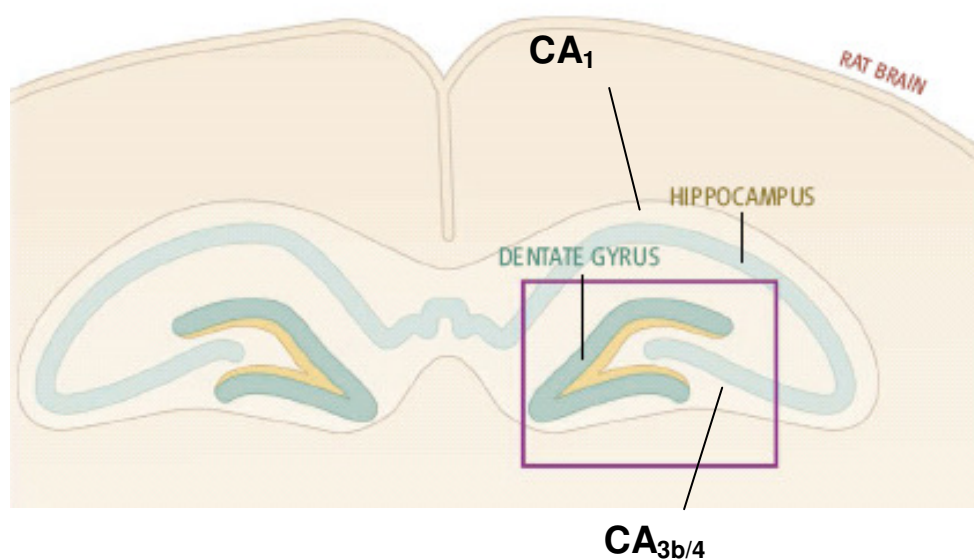


Abb. 3: Coronalalschnitt durch das Rattenhirn mit Darstellung der vorrangig von einer anfallsinduzierten Neurodegeneration betroffenen CA₁- und CA_{3b/4}-Region (mod. nach SCHARFMAN u. HEN 2007).

2.2.3 Neurogenese

Wie bereits in Kap. 2.2.1 erwähnt, konnte das lange Zeit gültige Dogma, dass die Regenerationsfähigkeit des Gehirns begrenzt ist, in den letzten Jahren entkräftet werden. So konnte gezeigt werden, dass in einigen Gehirnregionen eine kontinuierliche und lebenslange Neubildung von Neuronen erfolgt. Dies scheint insbesondere in der subgranulären Zone der Körnerzellschicht des Hippocampus (GAGE et al. 1998) und in der subventrikulären Zone des anterolateralen Seitenventrikels (GAGE 2002; MOMMA et al. 2002) möglich zu sein. Eine anfallsinduzierte Induktion der basalen Proliferation neuronaler Vorläuferzellen wurde wiederholt in akuten Krampfmodellen und in chronischen Epilepsiemodellen beobachtet (BENGZON et al. 1997; PARENT et al. 1998a; PARENT et al. 2006). Zudem zeigten CRESPEL et al. (2005) eine gesteigerte Neuronenneubildung bei humanen TLE-Patienten. Es gibt vermehrt Hinweise, dass der anfallsinduzierten Neuronenneubildung eine zentrale Bedeutung im Rahmen der epileptogenese-assoziierten Plastizität zugeordnet werden kann (PARENT 2002; PARENT u. LOWENSTEIN 2002; PARENT et al. 2006). Dies wird vor allem durch Untersuchungen gestützt, die ein atypisches Verhalten der neugebildeten Neurone beschreiben. Zum einen bilden einige der neugebildeten Körnerzellen aberrierende, d.h. in die supragranuläre Zone reichende, Axone aus (BUCKMASTER et al. 2002). Zum anderen wandern einige Vorläuferzellen in den Hilus des Hippocampus ein und differenzieren dort zu sogenannten ektopischen Körnerzellen aus (SCHARFMAN et al. 2003; JESSBERGER et al. 2005; PARENT et al. 2006). Bei diesen ektopischen Körnerzellen wurde wiederholt die Persistenz basaler, in den Hilus ziehender Dendriten beschrieben (DASHTIPOUR et al. 2003; SHAPIRO et al. 2005). Während bei sich normal entwickelnden Körnerzellen basale bzw. hilare Dendriten nur transient auftreten, konnte bei epileptischen Tieren (PEKCEC u. POTSCHKA 2007) und Epilepsiepatienten (VON CAMPE et al. 1997) eine Persistenz der basalen Dendriten beobachtet werden. Die auf Grund ihrer Morphologie, auch als persistierende, basale Dendriten bezeichneten pathomorphologischen Aberrationen könnten als prokonvulsive, strukturelle Netzwerkveränderungen gedeutet werden und so die Entstehung und Ausbreitung epileptischer Anfälle unterstützen (PEKCEC u. POTSCHKA 2007).

2.3 STRATEGIEN ZUR MODULATION ANFALLSINDUZierter VERÄNDERUNGEN

2.3.1 Einführung

Das Interesse, die ätiopathologische Bedeutung einzelner anfallsinduzierter Veränderungen im Zusammenhang mit der Entstehung einer Epilepsie zu untersuchen ist hoch. Ein verbessertes Verständnis über die an der Epileptogenese beteiligten Prozesse ist die Grundvoraussetzung für eine gezielte Modulation einzelner Veränderungen und essentiell für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Anfallsinduzierte Veränderungen können sich auf intrinsischer, synaptischer, morphologischer und genetischer Ebene manifestieren. Im Rahmen dieser Arbeit soll insbesondere die Bedeutung von anfallsinduzierten Veränderungen der neuronalen Plastizität auf morphologischer Ebene untersucht werden. Hierzu zählen morphologische Veränderungen der neuronalen Dendriten, eine gestörte Neuronenneubildung (PARENT et al. 1998b; SCOTT et al. 1998), sowie eine gesteigerte Neurodegeneration infolge apoptotischer und nekrotischer Vorgänge. In der Vergangenheit konnte demonstriert werden, dass neurodegenerative Prozesse erheblich an der Entstehung epilepsieassoziierter psychischer Störungen und kognitiver Defizite beteiligt sind und zudem den Prozess der Epileptogenese beeinflussen. Die Protektion neuronaler Zellen vor einer anfallsinduzierten Degeneration stellt auf Grund dessen eine hoffnungsvolle und bedeutsame Strategie zur Modulation der Epileptogenese sowie zur Behandlung epilepsieassoziierter Komorbiditäten dar. So hat die Untersuchung auf dem Markt befindlicher Antiepileptika hinsichtlich ihres neuroprotektiven Potentials (HALONEN et al. 2001; PITKANEN 2002; BRANDT et al. 2006b) und die Entwicklung neuer neuroprotektiv wirksamer Antiepileptika zunehmend an Bedeutung gewonnen. Zusätzlich wird momentan das neuroprotektive Potential alternativer Behandlungsmöglichkeiten von Epilepsien untersucht. Hierzu zählen die Administration von Antioxidantien (GUPTA et al. 2002; WANG et al. 2004; SHIN et al. 2007), eine Hormontherapie mit Östrogenen (VELISKOVA et al. 2000) bzw. Progesteron (HOFFMAN et al. 2003), die Behandlung mit neurotrophen Faktoren (SIMONATO et al. 2006) oder eine ketogene Diät (NOH et al. 2006). Zwar konnten mit diesen unterschiedlichsten Therapieansätzen erste partielle Effekte erzielt werden, weitreichende Erfolge blieben bis dato allerdings aus. Auf der Suche nach aussichtsreicheren Behandlungsstrategien befindet sich aktuell besonders das neuroprotektive Potential

von Erythropoetin, dem wichtigsten Regulationshormon der Erythropoese (DAME et al. 2001; CAMPANA u. MYERS 2003; MAIESE et al. 2004; SHANG et al. 2007; WU et al. 2007) im Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Zur Generierung eines proepileptogenen, neuronalen Netzwerkes tragen neben neurodegenerativen Prozessen eventuell weitere Veränderungen auf neuronaler Ebene bei. Hierzu zählen insbesondere eine gestörte Neuronen-neubildung mit dem Auftreten ektopischer Körnerzellen (SCHARFMAN et al. 2003; JESSBERGER et al. 2005; PARENT et al. 2006), die vermehrte Ausbildung persistierender, basaler Dendriten (BUCKMASTER et al. 2002; DASHTIPOUR et al. 2003) und ein daraus resultierendes aberrantes neuronales Netzwerk. Die Entwicklung neuer Strategien, die diesen Veränderungen entgegenwirken, ist ebenfalls ein bedeutendes Forschungsgebiet bei der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten für Epilepsien. Publikationen der letzten Jahre messen dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül (*neural cell adhesion molecule*, NCAM) und seiner polysialylierten Form (PSA-NCAM) als Regulator der neuronalen Plastizität eine große Bedeutung bei (KLEENE u. SCHACHNER 2004; PEKCEC et al. 2007). Wiederholt konnte gezeigt werden, dass das PSA-NCAM System das Neuritenwachstum beeinflusst und weiterhin funktionellen Einfluss auf die Migration, die Differenzierung und das Überleben sich neubildender Nervenzellen hat (CHAZAL et al. 2000; KISS et al. 2001; VUTSKITS et al. 2001; DECKER et al. 2002; PEKCEC et al. 2007). Aus diesen Gründen könnten Modulationen des NCAM-Moleküls zur Prophylaxe anfallsinduzierter, neuroplastischer Veränderungen geeignet sein.

2.3.2 Mimetische Peptide

Peptide bestehen aus einzelnen Aminosäuren, die wie eine Perlenkette aneinander gereiht sind. Die Aminosäuresequenz (= Primärstruktur) und die dreidimensionale räumliche Anordnung der Kette (Sekundär- und Tertiärstruktur) bestimmen dabei die Funktion des Peptides. Mimetische Peptide kopieren nicht die gesamte Aminosäuresequenz eines Proteins, sondern stellen nur einen kleinen funktionell bedeutsamen Ausschnitt aus der Perlenkette dar. Die Funktion des Peptides und somit seine volle Wirksamkeit bleibt unverändert während sich unerwünschte Effekte ausschalten lassen.

NCAM-mimetische Peptide

Das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM), ein Glycoprotein der Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle wird auf der Oberfläche aller Neurone exprimiert. NCAM ist an der Vermittlung von Zell-zu-Zell-Verbindungen beteiligt und so von großer Bedeutung für die Regulation der neuronalen Plastizität im zentralen Nervensystem (DOYLE et al. 1992; WALMOD et al. 2004). In ersten Untersuchungen konnten für NCAM-mimetische Peptide sowohl *in vivo* als auch *in vitro* schützende Effekte auf hippocampale Neurone im Rahmen eines ischämischen Insultes gezeigt werden (SKIBO et al. 2005). Des Weiteren ließen sich durch eine Behandlung mit NCAM-mimetischen Peptiden im Tiermodell neuropathologische Veränderungen und kognitive Beeinträchtigungen, hervorgerufen durch β -Amyloid, der Hauptkomponente seniler Plaques bei Alzheimer, reduzieren (BEREZIN u. BOCK 2004; KLEMENTIEV et al. 2007). Jüngst wurde von unserer Arbeitsgruppe die Bedeutung des NCAM-Systems für die Epileptogenese sowie für epilepsieassoziierte kognitive und psychiatrische Störungen untersucht (PEKCEC et al. 2008). Es zeigte sich, dass dieses System ein wichtiger Regulator der neuronalen Plastizität ist und zudem die Empfänglichkeit gegenüber epileptischen Anfällen, die anfallsinduzierte Neurogenese und epilepsieinduzierte Verhaltensänderungen beeinflusst (PEKCEC et al. 2008). In Anbetracht der Bedeutung des NCAM-Systems könnten NCAM-Derivate bei gezielter Auswahl der Peptidsequenz potentielle Modulatoren der anfallsinduzierten neuronalen Plastizität sein. Es ist denkbar, dass eine Behandlung mit NCAM-mimetischen Peptiden die anfallsinduzierte Neubildung von Neuronen, deren Migration, Differenzierung und Integration in das neuronale Netzwerk wesentlich beeinflusst. Weiterhin könnten sie über die NCAM-abhängige synaptische Plastizität direkte Auswirkungen auf die Anfallsinitiierung und die Anfallsausbreitung haben.

Erythropoetin-mimetische Peptide

Erythropoetin (EPO) ist ein in der Niere produziertes körpereigenes Hormon. Es ist der wichtigste natürliche Wachstumsfaktor der Erythropoese und regt die Bildung roter Blutzellen (Erythrozyten) in den Stammzellen des Knochenmarks an. In den letzten Jahren gewann EPO besonders an Bedeutung als erkannt wurde, dass es weitere zusätzliche nicht-hämatopoetische Effekte hat. Im Mittelpunkt des Interesses stehen derzeit besonders EPO-vermittelte Effekte im ZNS. Sowohl in *in vitro*

Untersuchungen als auch in verschiedenen Tiermodellstudien konnte eine anti-apoptotische und neuroprotektive Wirkung von EPO bestätigt werden (DAME et al. 2001; CAMPANA u. MYERS 2003; MAIESE et al. 2004; SHANG et al. 2007; WU et al. 2007). Besonders intensiv wurden die Effekte einer EPO-Behandlung in Tiermodellen der Ischämie untersucht. EPO reduzierte nicht nur neurodegenerative Vorgänge, sondern verhinderte auch ischämiebedingte Lernschwierigkeiten (SADAMOTO et al. 1998; BERNAUDIN et al. 1999; CELIK et al. 2002) und unterstützte die funktionelle Wiederherstellung (OLSEN 2003) des neuronalen Netzwerkes. YANG et al. (2007) untersuchten jüngst den Effekt von EPO in einem Status epilepticus Modell. Sie demonstrierten, dass eine Behandlung mit EPO den Grad einer anfallsinduzierten Degeneration hippocampaler Neurone reduziert. Erste klinische Studien untersuchen derzeit das therapeutische Potential von EPO für verschiedene neurologische Erkrankungen. Vorläufige Daten bestätigen die in präklinischen Studien festgestellten ZNS-Effekte. So reduzierte bei Schlaganfallpatienten eine dreitägige EPO-Behandlung den Grad der cerebralen Infarzierung (EHRENREICH et al. 2002). Aus diesen Gründen besteht ein verstärktes Interesse an den neuroprotektiven Eigenschaften von EPO. Man geht davon aus, dass es sich um erythropoese-unabhängige Prozesse handelt. Vielmehr scheinen EPO-vermittelte Effekte wie eine Beeinflussung des Gefäßendotheliums (CHONG et al. 2002), eine Rekrutierung von Stammzellen (SHINGO et al. 2001), eine direkte Entzündungsmodulation (SHINGO et al. 2001) und eine Reduktion der Produktion zelltoxischer Substanzen (DIGICAYLIOGLU u. LIPTON 2001) zum neuroprotektiven Potential von EPO beizutragen. Zudem zeigten DIGICAYLIOGLU und LIPTON (2001), dass EPO die zelltoxischen Wirkungen einer anfallsinduzierten Glutamatausschüttung verringert. Der Einsatz von EPO-Derivaten bietet den Vorteil, dass durch gezielte Peptidwahl EPO auf seine neuroprotektiven Effekte reduziert werden kann und hämatopoetische Effekte ausgeschaltet werden können. EPO-mimetische Peptide könnten demnach eine erfolgversprechende neue Strategie zur Modulation anfallsinduzierter, insbesondere neurodegenerativer Veränderungen, im epileptischen Gehirn sein.

2.4 PHARMAKORESISTENTE EPILEPSIEN

2.4.1 Einführung

Die bedeutendste Therapieform der Epilepsie ist nach wie vor die Pharmakotherapie (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002). Derzeit befinden sich mehr als 20 unterschiedliche Antiepileptika für den Humanpatienten auf dem Markt, die verschiedenartige Wirkungsweisen verfolgen. Auf Grund von Abweichungen in der Pharmakokinetik zwischen Mensch und kleinen Haustieren eignen sich jedoch viele dieser Antiepileptika nicht für eine Langzeittherapie beim Tier. Mittel der ersten Wahl bei Hund und Katze ist Phenobarbital (LÖSCHER 2003). Trotz der breiten Auswahl an Antiepileptika führt bei ungefähr einem Drittel der Menschen und Hunden mit Epilepsien eine medikamentöse Behandlung mit der optimalen täglichen Dosierung und einem bereits frühzeitigen Behandlungsbeginn zu keiner zufriedenstellenden Anfallskontrolle (SCHWARTZ-PORSCHKE u. JURGENS 1991; REGESTA u. TANGANELLI 1999; KWAN u. BRODIE 2000). Diese pharmakoresistente Epilepsieform ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Sowohl neu entwickelte weitere Antiepileptika mit anderen Wirkungsmechanismen als auch die Kombination unterschiedlicher Wirkstoffe führen bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten zu keinem Therapieerfolg. In der Humanmedizin mangelt es noch an einer einheitlichen Definition der Pharmakoresistenz von Epilepsien. Ungeachtet dessen bezeichnet man Patienten derzeit als pharmakoresistent, wenn sich bei ausreichender Therapiedauer und angemessener Auswahl und Dosierung auf eine Behandlung mit mindestens zwei Antiepileptika der ersten Wahl kein Behandlungserfolg einstellt. Ein Behandlungserfolg wird als Anfallsfreiheit oder zumindest als 50%ige Reduktion der Anfallsfrequenz definiert (REGESTA u. TANGANELLI 1999; KWAN u. BRODIE 2000). Die TLE mit Auftreten von komplex-fokalen Anfällen ist die häufigste Epilepsieform beim Menschen. Bei dieser Epilepsieform ist das Problem der Pharmakoresistenz besonders präsent. Bis zu 70% der TLE-Patienten sind medikamentös nicht therapierbar (LEPPIK 1992). Diesen Patienten bleibt als letzte Behandlungsoption oft nur ein chirurgischer Eingriff mit Resektion des epileptischen Fokus. Das ist allerdings nur möglich, wenn dieser gut identifizierbar, eindeutig abgrenzbar und chirurgisch gut erreichbar ist (FOLDVARY et al. 2001). Trotz Entfernung des epileptischen Fokus kann für eine optimale Anfallskontrolle oft nicht auf eine Fortsetzung der Pharmakotherapie im Anschluss an die durchgeführte Resektion verzichtet werden (LÖSCHER u.

SCHMIDT 2002). Weiteren Strategien, die man zudem für die Therapie resistenter Epileptiker untersucht hat, sind eine Vagusnervstimulation, eine ketogene Diät oder eine transkranielle Magnetstimulation (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002; KWAN u. BRODIE 2006). Diese Therapieansätze erwiesen sich zum Teil durchaus als erfolgsversprechend. Durchschlagende Vorteile dieser Behandlungsmöglichkeiten gegenüber einer medikamentösen oder chirurgischen Therapie konnten bisher allerdings nicht verzeichnet werden.

2.4.2 Mögliche Ursachen

Die Ursachen und Mechanismen der Pharmakoresistenz sind trotz einer verbesserten Kenntnis über die Ätiologie und Pathogenese von Anfällen und Epilepsie immer noch weitestgehend unbekannt. Derzeit geht man davon aus, dass es sich um einen multifaktoriellen Prozess handelt, bei dem genetische, krankheitsbedingte und pharmakotherapiebedingte Einflüsse eine große Rolle spielen (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002). Die mögliche Beteiligung genetischer Faktoren wie Polymorphismen könnte erklären, warum Patienten mit gleichen Epilepsieformen hinsichtlich des Ansprechens auf eine Pharmakotherapie stark differieren. Zu berücksichtigende krankheitsbedingte Faktoren sind die Anfallsätiologie, die Progression der Epilepsie unter der Behandlung mit Antiepileptika, Veränderungen in den Zielstrukturen der Medikamente oder Veränderungen bei der Aufnahme von Substanzen ins Gehirn. Unter pharmakotherapiebedingte Faktoren fällt unter anderem die Abnahme der Wirkung von Antiepileptika als Folge einer Toleranzentwicklung. Eine derzeit diskutierte Hypothese, die das Phänomen der Pharmakoresistenz erklärt, ist die sogenannte Multidrug-Transporter-Hypothese.

2.4.3 Multidrug-Transporter-Hypothese

Das Phänomen der Pharmakoresistenz bleibt nicht allein auf Epilepsien beschränkt, sondern kann auch im Rahmen der Behandlung von Krebserkrankungen, rheumatische Arthritiden und vielen anderen Krankheiten beobachtet werden. Man geht davon aus, dass ein aktiver Mechanismus, basierend auf verschiedenen sogenannten Multidrug-Transportern, für die Resistenz verantwortlich ist (Abb. 4). Bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten scheint eine Überexpression von Multidrug-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke dafür verantwortlich zu sein, dass

trotz eines hinreichend hohen Wirkstoffgehaltes des Antiepileptikums im Blut keine therapeutisch wirksame Konzentration im Bereich des epileptischen Fokus erreicht wird (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005). Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre unterstützen diese Hypothese. Im Mittelpunkt der Forschung stehen hier besonders die Funktion von *P-Glykoprotein* (Pgp) sowie die Funktion einiger Vertreter der *Multidrug-Resistance-Proteine* (MRPs) aus der **ATP-Binding-Cassette C-** (ABCC-) Familie.

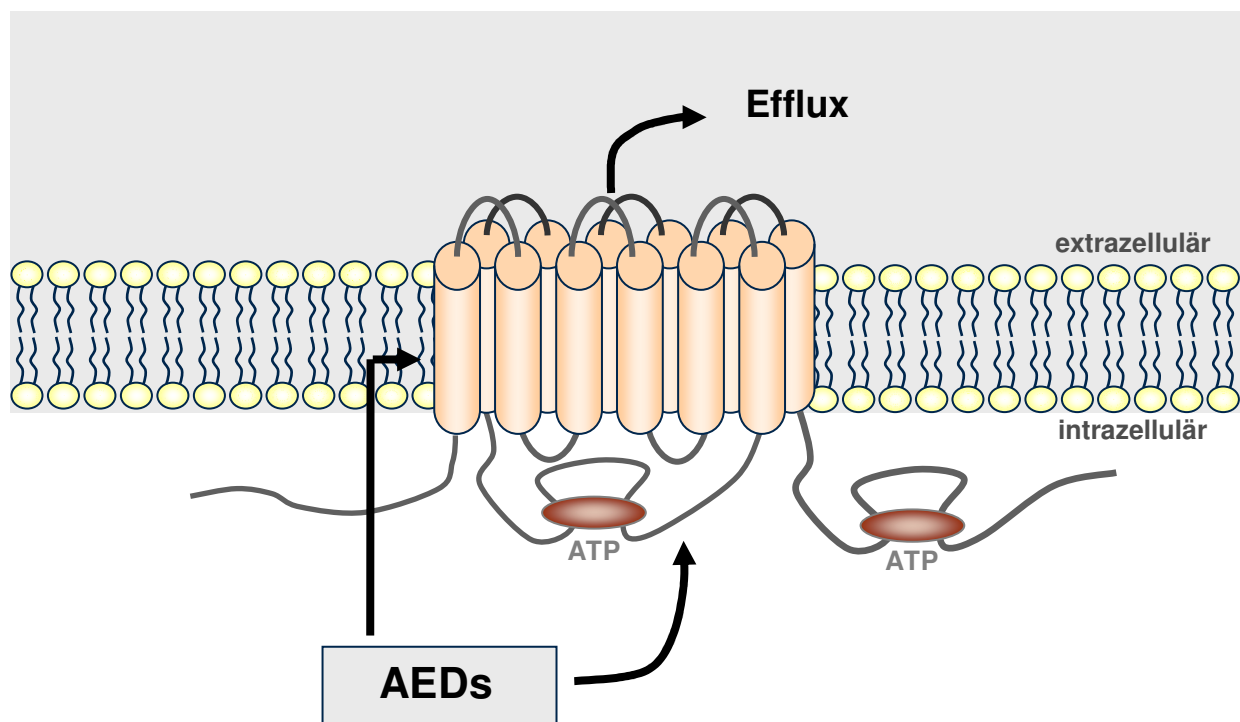


Abb. 4: Schematische Darstellung eines MDTs. MDTs sind in der Zellmembran lokalisiert und fördern ATP-abhängig den Effluxtransport verschiedener Substrate (u.a. AEDs) aus dem Intrazellular- in den Extrazellularraum (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005).

Blut-Hirn-Schranke

Um ins Gehirn zu gelangen, müssen pharmakologische Wirkstoffe die Blut-Hirn- sowie die Blut-Liquor-Schranke passieren. Beide fungieren als natürliche Barrieren des Gehirns. Die Blut-Hirn-Schranke wird von kapillären Endothelzellen, die von einer Basallamina umgeben sind, Perizyten und astrozytären perivaskulären Endfüßen gebildet (PARDRIDGE 2005). Die Endothelzellen sind über *tight junctions*

miteinander verbunden. So wird ein parazellulärer Substanztransport verhindert und eine strikte Abtrennung von Gehirnparenchym bzw. Cerebrospinalflüssigkeit und Blut erreicht. Ein endo- und transzytotischer Transport wird durch einen Mangel an pinozytotischen Transportvesikeln erschwert (LEE et al. 2001). Stoffwechselenzyme der Endothelzellen bilden eine zusätzliche enzymatische Barriere. Die Penetration der Endothelzellmembranen ist für große, hydrophile, polare Substanzen nahezu unmöglich. Im Unterschied hierzu können kleine, lipophile unpolare Wirkstoffe die Barriere mittels Diffusion oder durch einen carriervermittelten Transport passieren (SPECTOR et al. 2000; PARDRIDGE 2005). Zusätzlich wird die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke durch ein System an aktiven Effluxtransportern verstärkt. Diese Transporter, die in der luminalen oder basolateralen Membran lokalisiert sind, transportieren Substanzen energieabhängig, das heißt unter Verbrauch von Adenosintriphosphat zurück ins Blut (LEE et al. 2001; PARDRIDGE 2005) und verhindern so eine Akkumulation lipophiler Substanzen wie Xenobiotika, Steroidhormone oder Phospholipide im Gehirnparenchym. Vertreter dieser Effluxtransporter an der Blut-Hirn-Schranke sind einige Mitglieder der ABC-Superfamilie wie Pgp und verschiedene MRPs (LEE et al. 2001; DE BOER et al. 2003).

P-Glycoprotein

Pgp, das beim Menschen vom *multidrug resistance 1 (MDR1)*-Gen kodiert wird, wurde erstmals in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts als aktiver auswärtsgerichteter Effluxtransporter in Tumorzellen entdeckt (DANO 1973; JULIANO u. LING 1976). In folgenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Pgp auch physiologisch in vielen Organen des Körpers wie im Darm, in der Niere, in der Leber und in Endothelzellen exprimiert wird (FROMM 2000, 2004). Bei Nagern existieren zwei Pgp Isoformen, die von den beiden Genen *mdr1a* und *mdr1b* kodiert werden. Die Substratspezifität von *mdr1a* und *mdr1b* ist unterschiedlich, aber teilweise überlappend (SCHINKEL 1999). Im Bereich der Blut-Hirn-Schranke konnte eine Expression von Pgp sowohl in den perivaskulären astrozytären Endfüßen (PARDRIDGE et al. 1997; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005) als auch in der luminalen Membran der kapillären Endothelzellen (SCHINKEL 1999; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005) gezeigt werden. Ergebnisse unterschiedlicher Studien deuten dabei auf eine stärkere Expression von Pgp in Endothelzellen als auch in Astrozyten hin. In erster

Linie handelt es sich hierbei um *mdr1a*-Pgp (DEMEULE et al. 2002; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005). VOLK et al. (2004) stellten fest, dass es in der Folge von epileptischen Anfällen auch in Neuronen zu einer Pgp-Expression kommen kann. Im Gehirn gesunder Menschen wurde Pgp nach immunhistochemischer Färbung in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, aber nicht in Astrozyten und Neuronen detektiert (TISHLER et al. 1995; SISODIYA et al. 2002). Bei Epilepsiepatienten konnte zusätzlich eine Expression in Neuronen nachgewiesen werden (DOMBROWSKI et al. 2001; SISODIYA et al. 2002; ARONICA et al. 2003).

Transporterbasierte Pharmakoresistenz

Aufgrund seiner breiten Substratspezifität hat Pgp im Zusammenhang mit Pharmakoresistenzen eine große klinische Relevanz. In den letzten Jahren konnten zahlreiche AEDs als Substrate von Pgp identifiziert werden (Tab. 1). TISHLER et al. (1995) beschrieben erstmalig eine vermehrte Expression des *MDR1*-Gens und anderer Multidrug-Transporter-Gene bei pharmakoresistenten Patienten. Es wird angenommen, dass es durch die Überexpression der Multidrug-Transporter zu einem erhöhten aktiv auswärtsgerichteten Transport der AEDs kommt. Folglich kann trotz eines ausreichend hohen Blutplasmaspiegels des AED keine therapeutisch ausreichend wirksame Konzentration im Gehirnparenchym erreicht werden. Die Pharmakotherapie mit wirksamen AEDs ist deshalb ohne Erfolg.

	<i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>		
Antiepileptikum	Mikro- dialyse (Nager)	KO- Mäuse	Human- patient	Zellkultur		Quelle
				Humanes Pgp	Nager- Pgp	
Phenytoin	+	(+)	?	+	+	POTSCHKA u. LÖSCHER (2001) RIZZI et al. (2002) CUCULLO et al. (2007)
Carbamazepin	+	(+)	?	?	-	POTSCHKA et al. (2001) POTSCHKA u. LÖSCHER (2001) SILLS et al. (2002)
Oxcarbazepin	+	?	+	?	?	CLINCKERS et al. (2005) MARCHI et al. (2005)
Levetiracetam	-	?	?	?	?	POTSCHKA et al. (2004)
Phenobarbital	+	?	?	?	?	POTSCHKA et al. (2002)
Felbamat	+	?	?	?	?	POTSCHKA et al. (2002)
Lamotrigin	+	?	?	?	?	POTSCHKA et al. (2002)
Topiramat	?	+	?	?	?	SILLS et al. (2002)

Tab. 1: Als Substrate von Pgp nachgewiesene AEDs. Neben *in vitro* Daten sind auch *in vivo* Daten dargestellt, die mit der Mikrodialyse-Technik an Nagern oder durch Knockout Mäuse (KO-Mäuse) ermittelt wurden. + = Nachweis erfolgt; (+) = Datenlage nicht eindeutig; ? = Ergebnisse nicht eindeutig; - = kein Nachweis

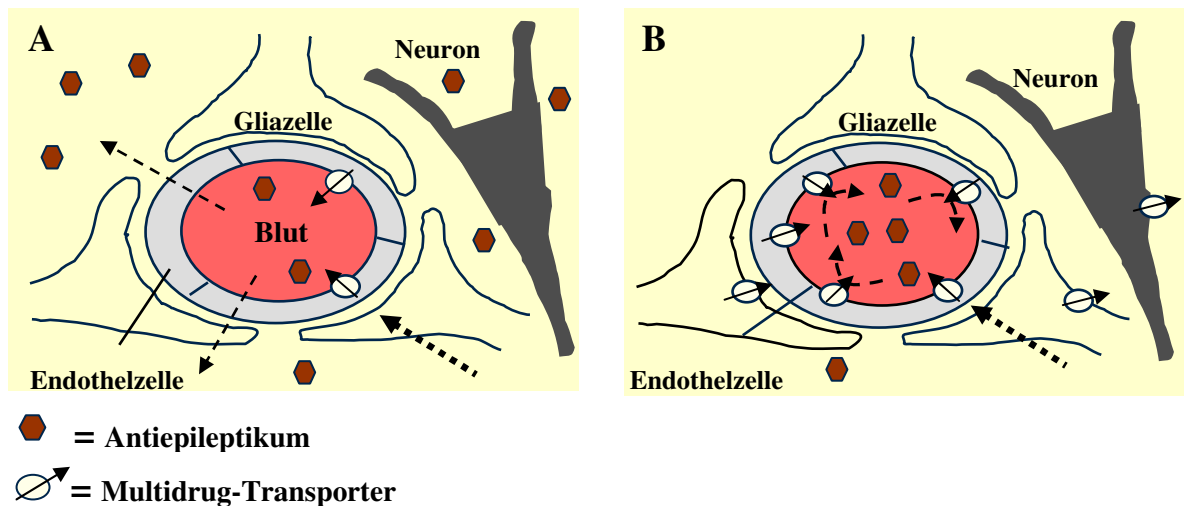


Abb. 5: Expression von MDTs an der Blut-Hirn-Schranke (modifiziert nach LÖSCHER u. POTSCHKA (2002)). Im physiologischen Zustand (A) wird eine therapeutisch ausreichende AED-Konzentration im Gehirnparenchym erreicht. Die Überexpression von MDTs bei Pharmakoresistenz (B) bedingt einen vermehrten auswärtsgerichteten Transport der AEDs, so dass kein ausreichenden Wirkstoffspiegel im Bereich des epileptischen Fokus erreicht werden kann.

In Studien an Tiermodellen der TLE wurde eine vermehrte Expression von Pgp und MRP's in Endothelzellen und Astrozyten der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation der Überexpression mit dem epileptischen Fokus assoziiert (POTSCHKA et al. 2004) ist (Abb. 5). Derzeitig geht man davon aus, dass epileptische Anfälle über einen kaskadenartigen Verlauf unterschiedlicher Mechanismen eine vermehrten Expression von Multidrug-Transportern bedingen.

2.5 STRATEGIEN ZUR ÜBERWINDUNG DER PHARMAKORESISTENZ

2.5.1 Einführung

Die Überwindung der Pharmakoresistenz ist ein zentraler Forschungsschwerpunkt der letzten Jahre. Basierend auf der Multidrug-Transporter-Hypothese werden unterschiedliche Strategien verfolgt, deren primäres Ziel eine Konzentrationserhöhung der Antiepileptika im Bereich des epileptischen Fokus ist. Grundsätzlich gibt es drei verschiedene Ansätze: die Prävention der Transporter-Überexpression (BAUER et al. 2008), die Umgehung der Transporter (GULYAEV et al. 1999; KREUTER 2001; HAU et al. 2004) und die Modulation der Transporterfunktion durch kompetitive und nicht kompetitive Inhibitoren (CLINCKERS et al. 2005; BRANDT et al. 2006a). Die Strategie, einer Multidrug-Transporter Überexpression bereits zu einem frühen Zeitpunkt präventiv entgegen zuwirken, ist ein vielversprechender Ansatz der letzten Jahre. Im Mittelpunkt jüngster Untersuchungen steht in diesem Zusammenhang besonders die Bedeutung der neuronalen Cyclooxygenase II (COX II). So geht man momentan davon aus, dass eine anfallsinduzierte gesteigerte Glutamatausschüttung über einen kaskadenartigen Verlauf zunächst zu einer gesteigerten COX II-Expression und im Weiteren zu einer Pgp-Überexpression führt (BAUER et al. 2008). Es konnte bereits gezeigt werden, dass spezifische COX II-Hemmstoffe einer Pgp-Überexpression entgegen wirken können (PATEL et al. 2002). Derzeit wird in diversen Tiermodellen der Epilepsie der Einfluss selektiver COX II-Hemmstoffe auf eine anfallsinduzierte Pgp-Überexpression untersucht (BAUER et al. 2008). Ein weiterer Ansatz bei der Suche nach Möglichkeiten zur Überwindung pharmakoresistenter Epilepsien ist eine Umgehung der Transporter. Eine nur geringfügig invasive Methode, die diesen Ansatz verfolgt, ist die intranasale (i.n.) Applikation. Sie bietet die Möglichkeit, Substanzen unter Umgehung des Blutweges und damit auch der Blut-Hirn-Schranke direkt in das Gehirngewebe zu verbringen. Für unterschiedlichste Wirkstoffe wird derzeit das Potential der i.n. Applikation als mögliche Administrationsart untersucht (ILLUM 2004; CZAPP et al. 2008). Eine weitere Strategie zur Überwindung der transporterbasierten Pharmakoresistenz ist die Modulation der Transporterfunktion durch eine direkte kompetitive bzw. nicht-kompetitive Inhibition der Multidrug-Transporter. Mehrere Generationen an Multidrug-Transporter-Hemmstoffen wurden bereits entwickelt. Verapamil, ein Hemmstoff der ersten Generation, ist ein

kompetiver Hemmstoff von Pgp. Die Wirkung von Tariquidar, einer Substanz der dritten Generation, beruht auf einer nicht-kompetitiven Inhibition des Multidrug-Transporters. Für Tariquidar konnten jüngst erste vielversprechende Ergebnisse in tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden. Bei Ratten, die auf eine Behandlung mit dem Antiepileptikum Phenobarbital nicht ansprachen, führte eine Add-on-Therapie, d.h. eine Zusatztherapie mit dem Multidrug-Transporter-Hemmstoff Tariquidar, zu einer fast vollständigen Kontrolle der Anfallsfrequenz (BRANDT et al. 2006a). Verapamil wurde bereits in klinischen Studien getestet und führte bei Epilepsiepatienten zu einer verbesserten Anfallskontrolle (SUMMERS et al. 2004). Beobachtete Nebenwirkungen (MACPHEE et al. 1986) schränken die Anwendung am Patienten bisher allerdings noch ein. Eine mögliche Alternative zur direkten Inhibition der Multidrug-Transporter durch spezifische Transporter-Hemmstoffe basiert auf dem Phänomen der RNA-Interferenz, eine neue Form der Genregulation.

2.5.2 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein sequenzspezifischer und posttranskriptionell ansetzender Mechanismus in eukaryotischen Zellen, bei dem doppelsträngige, kurze interferierende RNA-Moleküle (small interfering RNA, siRNA) zum Stummschalten von einzelnen Genen (gene silencing) führen (UPRICHARD 2005). Vermutlich dient das Programm der RNAi als natürlicher Abwehrmechanismus gegen Viren und andere Pathogene. Aktiviert wird es, wenn doppelsträngige Ribonucleinsäuren, die dem Genom von Viren ähneln, in die Zelle gelangen. Ausschlaggebende Hinweise auf das bis dahin unbekannte Phänomen der RNAi erlangten FIRE et al. (1998) erstmalig in Untersuchungen an dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Schnell wurde erkannt, dass das biologische Prinzip der RNAi, wenngleich vom Mechanismus her komplizierter, auch in höheren Organismen vorkommt. Der Mechanismus der RNAi beruht auf einer Vielzahl intrazellulär stattfindender Prozesse und kann in zwei Phasen differenziert werden (Abb. 6). In der sogenannten Initiationsphase werden in einem ersten Schritt doppelsträngige RNA-Moleküle endogenen oder exogenen Ursprungs durch die Spaltungsaktivität einer als „Dicer“ bezeichneten Endonuclease in kleine 21-23 Basenpaare (bp) umfassende doppelsträngige siRNAs zerlegt. In der folgenden Effektorphase werden diese kleinen interferierende RNA-Moleküle in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) eingebaut, der daraufhin aktiviert wird. Dabei kommt es zu einer Entwindung

der beiden siRNA-Stränge (sense und antisense) und es entscheidet sich, welcher Strang als dominanter „Guide“-Strang eingebunden und welcher als „Passenger“-Strang davon ausgeschlossen und enzymatisch abgebaut wird. Der führende „Guide“-Strang dient als Matrize für die Erkennung homologer mRNA. Er bindet sequenzspezifisch durch Hybridisierung an die Ziel-mRNA und bringt so den RISC-Komplex mit seiner RNA-Helicase und Nuclease-Aktivität in räumliche Nähe. Es schließt sich in einem nächsten Schritt die Entwindung und Spaltung der Ziel-mRNA an, die beginnend an ihren ungeschützten Enden in der Folge rasch durch intrazelluläre Nucleasen abgebaut wird. Der RISC-Komplex kann derweil wiederum an eine neue sequenzspezifische Ziel-mRNA binden (ELBASHIR et al. 2001).

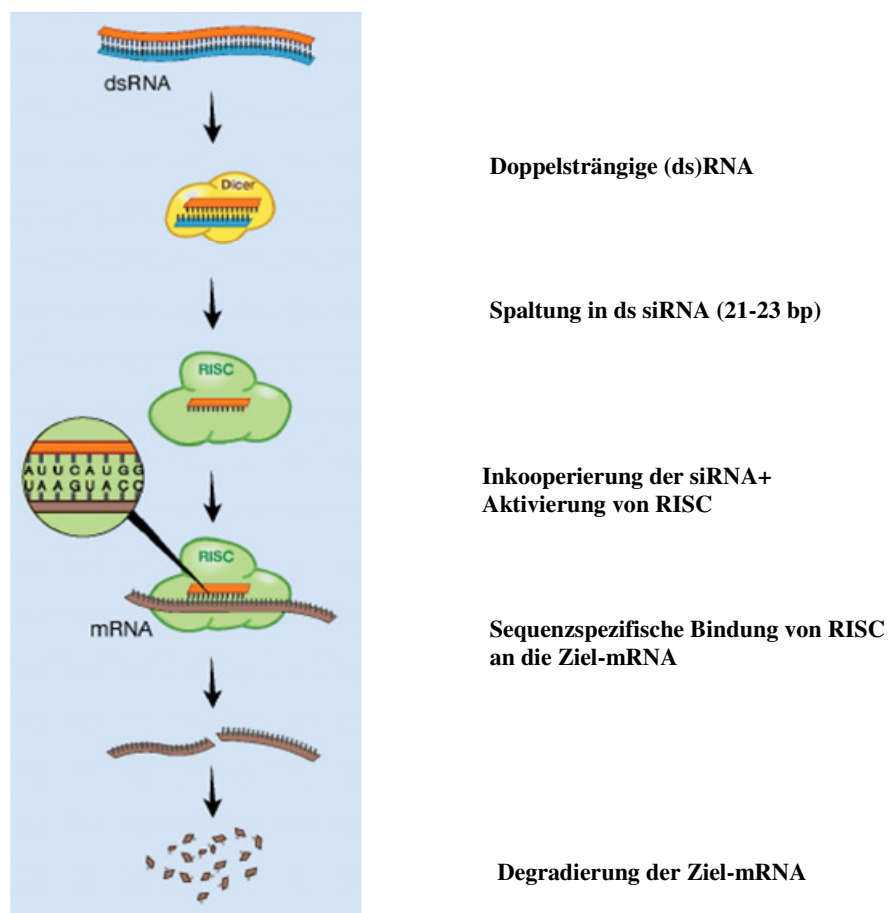


Abb. 6: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz (RNAi). Nach Spaltung der dsRNA in siRNA werden diese von RISC eingebaut und binden nach dessen Aktivierung sequenzspezifisch an ihre Ziel-mRNA. Diese wird daraufhin rasch abgebaut und steht damit nicht mehr zur Proteinproduktion zur Verfügung (modifiziert nach www.medgadget.com)

Therapeutisches Potential

Eine mögliche therapeutische Nutzung des RNAi-Mechanismus wird bereits jetzt als einer der wichtigsten und bedeutsamsten Fortschritte des vergangenen Jahrzehnts in der biomedizinischen Forschung angesehen. Auf Grund der breiten Anwendungsmöglichkeiten der RNAi ist zu vermuten, dass es in naher Zukunft zur Entwicklung einer ganzen Reihe von Therapeutika kommen wird, deren Wirkung auf einer gezielten Expressionshemmung krankheitsassoziierten Gene beruht. Hierzu wurden in jüngster Vergangenheit zahlreiche *in vivo* Studien mit lokalen oder systemischen Applikationsansätzen durchgeführt. In bisherigen *in vivo* Versuchen und ersten klinischen Prüfungen zeigte sich eine gute Verträglichkeit der siRNA-Moleküle (DYKXHOORN u. LIEBERMAN 2006a; FEDOROV et al. 2006; PEI u. TUSCHL 2006). Trotzdem wurde über mögliche Nebenwirkungen bei einer Behandlung mit siRNA berichtet. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte siRNA-Sequenzen Zellen des Immunsystems unspezifisch stimulieren (MARQUES u. WILLIAMS 2005), sowie Genbereiche aktivieren können, die in die Interferon-Antwort von Säugerzellen eingebunden sind (LEUNG u. WHITTAKER 2005). Allerdings ist noch unklar wie häufig und unter welchen Umständen siRNA-Moleküle solche sogenannten „Off-Target-Effekte“ bewirken können (LEUNG u. WHITTAKER 2005). Ein weiteres Problem bei der Anwendung am Patienten ist die geringe Stabilität unverbundener siRNA. Nucleasen im Blutplasma sowie Kontakt mit anderen Körperflüssigkeiten können innerhalb kürzester Zeit zu einer Zerstörung der empfindlichen RNA-Moleküle führen. Zum Schutz der siRNA vor Endonucleasen und zur Verbesserung einer effizienten „drug delivery“ wurden unterschiedliche Modifikationen der siRNA-Moleküle, unter anderem eine Verpackung in Liposomen verfolgt (DYKXHOORN u. LIEBERMAN 2006b). Beachtliche Erfolge beim Einsatz von siRNA als Therapeutika ließen sich bisher besonders bei der Entwicklung eines siRNA-Medikamentes gegen das Respiratorische Syncytial Virus (RSV) verzeichnen. Eine lokale Administration von siRNA in die Lungen führte im Mausmodell zu einer Reduktion des RSV-Virustiters (DE FOUGEROLLES et al. 2005) und wird inzwischen in Phase-I-Studien am Humanpatienten getestet. Eine japanische Arbeitsgruppe verzeichnete kürzlich erste Erfolge beim Einsatz Pgp-zielgerichteter siRNA (MATSUI et al. 2005). Im Mausmodell gelang ihnen durch Applikation anti-*mdr1*-siRNA mittels der sogenannten hydrodynamischen Methode eine Reduktion des mRNA-Gehaltes im Lebergewebe um 50-60%.

Stabilität von siRNA und siRNA-Delivery

Für den Einsatz von siRNAs im Organismus ist nicht einzig die Effizienz der Hemmung der Genexpression bedeutsam. Es sind vor allem Faktoren wie die Stabilität, Spezifität und Bioverfügbarkeit entscheidend (PEI u. TUSCHL 2006). Unverpackte siRNA hat eine geringe Stabilität und überdauert nur eine kurze Zeit im Organismus. Als bald wird sie von Plasma-Nucleasen und anderen Körperflüssigkeiten zerstört. Ein weiteres zu überwindendes Hindernis ist die zelluläre Aufnahme. SiRNAs werden von den meisten Zellen nicht ohne weiteres aufgenommen, so dass bei therapeutischen Ansätzen nach Möglichkeiten zur Verbesserung des Transportes in die Zelle gesucht werden muss. In den vergangenen Jahren wurde einer Vielzahl von Strategien nachgegangen, um sowohl die Stabilität der siRNAs zu erhöhen, als auch deren zelluläre Aufnahme zu verbessern. Zur Erzielung einer erhöhten Stabilität haben sich besonders chemische Abwandlungen der Ribose oder Phosphodiesterasebindungen als nützlich erwiesen. So führt der Einsatz von Thiophosphaten zu einem gesteigerten Schutz der RNA-Moleküle und verhindert einen frühzeitigen Abbau durch Exonucleasen (CZAUDERNA et al. 2003; DYKXHOORN u. LIEBERMAN 2006b). Des Weiteren zeigte sich, dass die Kopplung von siRNAs mit Cholesteringruppen zum einen die zelluläre Aufnahme steigern konnte, zum anderen auch die Halbwertszeit der siRNA im Plasma verlängerte (DE FOUGEROLLES et al. 2005). Gute Fortschritte beim Einsatz von siRNA in Primaten erzielten jüngst ZIMMERMANN et al. (2006), indem sie die RNA-Moleküle in Nanopartikel verpackten. Hierbei verwendeten sie polyethylenglycol-haltige, kationische Liposomen, sogenannte „stable nucleic acid lipid particles“. Die Liposomen fungieren als *Carrier*. Während das Polyethylenglycol die Stabilität des siRNA-Liposomen-Komplexes *in vivo* erhöht, wird durch die Kopplung von Antikörper über eine spezifische Bindung an endogene Rezeptoren eine präzise Zielsteuerung ermöglicht (BOADO 2005).

Applikationsarten

Bei der *in vivo*-Anwendung von siRNAs gibt es, wie bei allen Wirkstoffen, prinzipiell zwei mögliche Verabreichungswege, die ein Erreichen des gewünschten Wirkortes gestatten. Neben der systemischen Applikation bei der der Wirkstoff ins Blutgefäßsystem injiziert wird und über den Blutkreislauf das Zielgewebe erreicht, können Substanzen auch direkt in das Zielorgan appliziert werden (lokale

Applikation). Die systemische siRNA-Applikation ist einfach und wird bei vielen Untersuchungen bevorzugt. Sie bietet die Möglichkeit sämtliche Körperregionen zu erreichen. Die systemische Applikation „unverpackter“, das heißt chemisch unmodifizierter siRNA, wird in den meisten Fällen mittels der sogenannten hydrodynamischen Methode vorgenommen. Unterschiedliche Arbeitsgruppen verzeichneten mit diesem Ansatz eine effiziente Induktion der RNAi (LEWIS u. WOLFF 2005; MATSUI et al. 2005). Jedoch ist der Grad der Durchblutung des Zielgewebes von entscheidender Bedeutung, so dass bisher größere Erfolge nur in stark vaskularisierten Geweben wie Leber, Niere und Milz erreicht wurden (LEUNG u. WHITTAKER 2005). Für die lokale Applikation oder zumindest zielgewebsnahe Applikation der siRNA wurden bislang unterschiedlichste Vorgehensweisen verfolgt. So finden sich Beschreibungen über subretinale, intradermale (LEUNG u. WHITTAKER 2005), intraoculare (CHECK 2005), intraventikuläre (DORN et al. 2004), intratracheale (MOSCHOS et al. 2007), intrathecale (TAN et al. 2005), intranasale (ZHANG et al. 2005) oder intratumorale (DE MARTIMPREY et al. 2008) Anwendungen.

3 ZIELSETZUNG UND ARBEITSHYPOTHESEN

Die genauen Mechanismen, die nach Entstehung eines initialen Insultes zur Manifestation einer Epilepsie führen, sind im Detail nicht bekannt. Daher ist eine wünschenswerte prophylaktische Therapie, welche die Entstehung einer Epilepsie verhindert, bisher nicht möglich. Stattdessen stellt die Pharmakotherapie nach wie vor die wichtigste Therapieform bei Epilepsien dar. Diese führt bei vielen Epilepsiepatienten zu keiner zufriedenstellenden Anfallskontrolle. Die pharmakoresistente Form der Epilepsie stellt ein bedeutendes Gesundheitsproblem, verbunden mit einer hohen Morbidität und Mortalität, dar. Ein Hindernis bei der Entwicklung neuer Strategien zur Prophylaxe und Therapie von Epilepsien ist sicherlich die mangelnde Kenntnis über die Prozesse, welche der Pharmakoresistenz als auch der Epilepsieentstehung zugrunde liegen. Das Erlangen neuer Erkenntnisse über die genauen Mechanismen ist daher wesentlich für die Entwicklung einer Prävention oder Therapie. In dem geplanten Dissertationsvorhaben soll deshalb die experimentelle Prüfung möglicher neuer Strategien sowohl zur Prophylaxe als auch zur Therapie von Epilepsien erfolgen. Dabei werden zwei verschiedene Ansätze verfolgt:

1. Diverse Publikationen der letzten Jahre beschreiben im Zusammenhang mit dem Prozess der Epileptogenese mannigfaltige Veränderungen der neuronalen Plastizität. Von zentraler Bedeutung sind insbesondere die gestörte Neubildung sowie der Verlust und Untergang von Neuronen. Diesen anfallsinduzierten neuropathologischen Veränderungen spricht man zum derzeitigen Wissensstand eine wesentliche Beteiligung an der Entstehung eines epileptogenen, prokonvulsiven Netzwerkes zu, das schließlich in der Manifestation einer Epilepsie resultiert. Folglich könnte die Verhinderung oder zumindest Beeinflussung dieser anfallsinduzierten neuronalen Plastizitätsveränderungen sich günstig auf den Gesamtprozess der Epileptogenese auswirken. Erstrangiges Ziel ist sicherlich die prophylaktische Verhinderung einer Epilepsie. Zumindest sollte aber eine Reduktion des Schweregrades der Epilepsie und/ oder Verringerung des Anteils pharmakoresistenter Epilepsiepatienten erreicht werden. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass die anfallsinduzierte neuronale Plastizität durch NCAM- und EPO-mimetische Peptide beeinflusst werden könnte.

Aus diesen Zielen ergeben sich folgende im Rahmen dieser Arbeit zu klärende Fragestellungen:

- Wie wirkt sich in etablierten SE-Modellen eine Behandlung mit dem NCAM-mimetischen Peptid Plannexin bzw. mit den EPO-mimetischen-Peptiden Epotris und Epobis auf die Art, Schwere und Dauer des SE bzw. die Mortalität infolge des SE aus?
- Inwieweit lassen sich anfallsinduzierte Veränderungen der neuronalen Plastizität, insbesondere die gestörte Neubildung von Neuronen sowie der Verlust von Neuronen infolge apoptotischer und nekrotischer Mechanismen verhindern?

2. Dem Multidrug-Transporter Pgp wird im Zusammenhang mit dem Auftreten pharmakoresistenter Epilepsien eine wichtige Rolle zugeordnet. Die Inhibition der Pgp-Expression mittels RNAi könnte folglich eine Möglichkeit zur Überwindung der Pharmakoresistenz darstellen. Um die Eignung der RNAi als Behandlungsstrategie bei pharmakoresistenten Epilepsien beurteilen zu können, sollen im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Eignet sich der Mechanismus der RNAi zur Inhibition der Pgp-Expression *in vivo*?
- Bei welcher *in vivo* Applikationsmethode erreicht die siRNA ihr Ziel am effizientesten und zeigt eine hohe Stabilität?
- Welche Behandlungsdauer bewirkt eine Inhibition der Pgp-Expression?

Es kann davon ausgegangen werden, dass die geplanten Untersuchungen einen beachtlichen Beitrag bei der Suche nach neuen Strategien zur Überwindung der transporterbasierten Pharmakoresistenz bei Epilepsiepatienten sowie zur Prophylaxe symptomatischer Epilepsien liefern.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 MODULATION ANFALLSINDUZierter NEURONALER VERÄNDERUNGEN DURCH MIMETISCHE PEPTIDE

4.1.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen zur Modulation anfallsinduzierter neuronaler Veränderungen durch mimetische Peptide wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuches (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-40-07) durchgeführt. Für die Versuche im chemischen Status epilepticus (SE)-Modell wurden weibliche Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln) mit einem Gewicht von 180-210 g verwendet. Weibliche Sprague-Dawley Ratten des gleichen Versuchstierzüchters mit einem Ankunfts-gewicht von 200-224 g wurden hingegen bei den Versuchen mit elektrischer Stimulation der basolateralen Amygdala benutzt. Die Tiere wurden in Gruppen von bis zu fünf Tieren in Makrolonkäfigen Typ IV gehalten. Als Einstreu der Käfige diente Weichholzgranulat (Equi Power Allround Späne; Fa. Vetripharm, Kaufering). Die Ratten erhielten Höveler Rattenfutter Nr. 10630 (Höveler, Dormagen) und Leitungswasser ad libitum. Das Futter wurde einmal pro Woche und das Wasser zweimal pro Woche erneuert. Einmal in der Woche wurden die Tiere in frische Käfige umgesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Umsetzen stets ein bis zwei Tage vor den Versuchen stattfand, um eine Beunruhigung der Ratten direkt vor dem Experiment zu vermeiden. Die Tiere wurden bei einem zwölf Stunden Hell-Dunkel-Zyklus (Licht an 7:00; Licht aus 19:00 MEZ), bei einer Umgebungstemperatur von 20-24 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten. Nach der Ankunft hatten die Tiere bis Versuchsbeginn mindestens vier Tage Ruhe, um sich an die neuen Bedingungen zu habituierten. Alle Tiere wurden an mindestens drei Tagen vor dem geplanten Versuch durch Handling (Injektionen und Wiegen) an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Die Versuche wurden immer zwischen 7:00 und 9:00 MEZ begonnen, um circadiane Einflüsse möglichst gering zu halten (STEWART et al. 2001).

4.1.2 Chemisches SE-Modell

Fraktioniertes Lithium-Pilocarpin-Modell

Durch systemische Applikation des parasympathomimetisch wirksamen Alkaloids Pilocarpin kann ein SE induziert werden. Alle Ratten erhielten 14h vor der ersten

Pilocarpin-Applikation eine i.p.-Injektion einer Lithiumchlorid-Lösung (127 mg/kg Lithiumchlorid, gelöst in 3 ml/kg 0,9%iger Natriumchloridlösung, pH-Wert 6–7). Zur Minimierung peripherer cholinergischer Wirkungen des Pilocarpins, wurde allen Tieren 30 min vor der ersten Pilocarpinapplikation Methyloscopolamin (1 mg/kg Methyloscopolamin, gelöst in 2 ml/kg 0,9%iger Natriumchloridlösung, pH-Wert 6) i.p. verabreicht. Die Pilocarpin-Applikation erfolgte fraktioniert, d.h. die Tiere erhielten die Injektionen (10 mg/kg Pilocarpin gelöst in 1 ml 0,9%iger Natriumchloridlösung) alle 30 min (bis zu maximal 12 Injektionen) bis zur Auslösung eines generalisierten SE. Kontrollratten wurden einmalig mit einem entsprechenden Volumen 0,9%iger Natriumchloridlösung i.p. behandelt. Nach der Pilocarpingabe wurden die Ratten beobachtet und die Anfallsstadien bewertet (Tabelle 2 in Kap. 4.1.4). Der SE wurde exakt 90 min nach Beginn mit 10 mg/kg Diazepam i.p. unterbrochen. Bei gegebenenfalls anhaltender motorischer Anfallsaktivität wurde die Diazepam-Injektion bis zu einer kompletten Suppression der Anfallsaktivität in gleicher Dosierung bis zu fünf mal wiederholt. Zwischen den Injektionen wurde ein zeitliches Intervall von anfänglich 3 min dann zweimal 5 min und nachfolgend 10 min eingehalten.

4.1.3 Elektrisches SE-Modell

Elektrodenimplantation

Die Implantation der Ableitungs- und Stimulationselektrode (bipolare Elektroden aus rostfreiem Stahl mit einer Ummantelung aus Teflon) erfolgte mittels stereotaktischer Operationstechnik. In einem ersten Schritt wurden die Tiere mit dem Narkotikum Chloralhydrat (360 mg/kg intraperitoneal (i.p.) in 10 ml/kg 0,9%iger NaCl-Lösung) narkotisiert. Zur exakten Positionierung der Implantate wurden die Ratten dann in einen stereotaktischen Apparat (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) eingespannt. Zur Orientierung für eine punktgenaue Implantation wurde der stereotaktische Atlas von PAXINOS und WATSON (2005) herangezogen. Dieser gibt die Lage der Hirnstrukturen in Bezug auf Bregma (rostraler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) wieder. Die Oberkieferhalterung wurde auf -3,9 mm ventral der Interaurallinie eingestellt, so dass Lambda (caudaler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) und Bregma auf der gleichen Höhe lagen, wie es im stereotaktischen Atlas vorgegeben ist (Abb. 7).

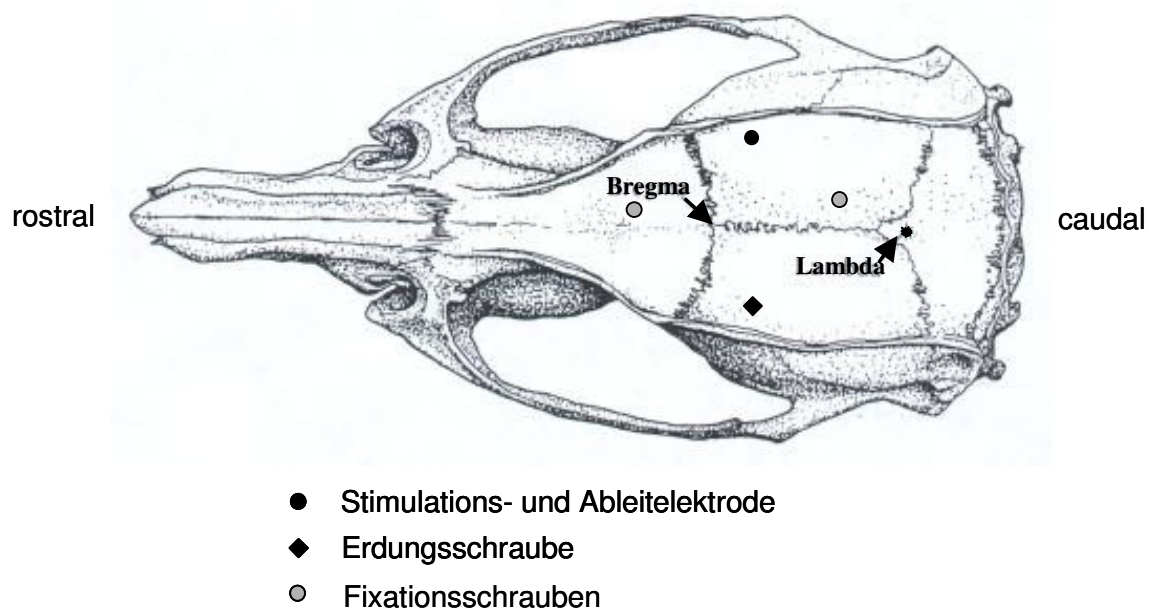


Abb. 7: Aufsicht auf den Rattenschädel mit Darstellung der Lokalisation der Stimulations- bzw. Ableitelektrode und der Fixationsschrauben. Nach PAXINOS und WATSON (2005).

Die Implantation der Stimulationselektrode in die basolaterale Amygdala (BLA) erfolgte, basierend auf im Vorfeld durchgeführten Lokalisationsversuchen, im Bereich der rechten Hemisphäre anteriorposterior (ap) +4,8; lateral (lat) +2,2; dorsoventral (dv) +8,6 (PAXINOS u. WATSON 2005). In Ergänzung zu den beiden Fixationsschrauben wurde gegenüberliegend der implantierten Tiefenelektrode mittels einer Schraube eine indifferente Erdungselektrode am Schädelknochen der Ratte befestigt (Abb. 7). Diese bestand aus einer Schädelschraube, die über einen teflonisolierten Draht mit einer Messingbuchse verbunden war. Zur dauerhaften Befestigung der Elektroden und der Fixationsschrauben am Schädelknochen wurde kaltpolymerisierender Kunststoff (Paladur[®], Fa. Kutzer, Weinheim) verwendet. Zur Vermeidung einer möglichen Wundinfektion wurde die erste Schicht Paladur[®], die direkten Kontakt zum Schädelknochen hatte, mit 2,1% Gentamicinsulfat (Sigma Aldrich, München) gemischt. Zusätzlich wurde den Tieren 20 mg/kg Gentamicin (Frieso-Gent[®], Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) im Anschluss an die Operation einmalig intramuskulär (i.m.) und an den beiden folgenden Tagen dann einmal täglich subkutan (s.c.) appliziert. Diese Antibiosebehandlung wurde für weitere fünf Tage mit einer zweimaligen täglichen Gabe von 100 mg/kg

Chloramphenicolsuccinat (Sigma Aldrich, München) i.m. fortgesetzt. Auf die Operation folgte eine sechswöchige Regenerationsphase.

SE-BLA-Modell

Bei diesem Epilepsiemodell wird elektrisch, durch eine 25-minütige Stimulation der basolateralen Amygdala, ein sich selbst erhaltender SE (SSSE) in naiven Ratten induziert. Vor Stimulationsbeginn wurde zunächst das Körpergewicht der Tiere ermittelt. In einem nächsten Schritt wurden die Ratten an ihrem Steckeraufsatz über ein zweiaderiges abgeschirmtes Kabel mit der Aufzeichnungseinheit verbunden. Das EEG wurde für einige Minuten vor der Stimulation aufgezeichnet, um mögliche individuelle Normabweichungen zu erfassen. Danach folgte die Verbindung der Tiere ebenfalls über ein zweiadriges abgeschirmtes Kabel mit der Stimulatoreinheit (Accupulser Modell A310C und Stimulus Isolator A365, World Precision Instruments, Berlin). Während der kontinuierlich über 25 min ablaufenden Stimulation wurden pro Sekunde zwei Einzelpulsserien (100 ms Dauer mit 1 ms dauernden, alterierend positiv-negativ geladenen Rechteckimpulsen) mit einer Frequenz von 50 Hz und einer Stromstärke von 700 μ A erzeugt. Die Tiere wurden die gesamte Stimulationszeit beobachtet und die Anfallsschwere nach der in Tabelle 2 in Kap. 4.1.4 angeführten Skala bewertet. Nach Ablauf der 25-minütigen Stimulationsdauer wurden die Ratten erneut mit der Aufzeichnungseinheit verbunden und für einige Minuten ein EEG aufgezeichnet. Als SSSE wurde eine anhaltende, motorische Krampfaktivität der Stadien I-V definiert, die mit einer charakteristischen EEG-Veränderung (mindestens 3 Hz mit doppelter Amplitudenhöhe wie Ausschläge im Ruhe-EEG) einherging. Der SE wurde exakt nach 240 min nach Stimulationsbeginn mit 10-25 mg/kg Diazepam i.p. abgebrochen. Anschließend wurden die Ratten kontinuierlich beobachtet. Das Auftreten, die Dauer und die Schwere isolierter Anfälle sowie der Typ des SSSE wurden dokumentiert. Tiere, bei denen kein SSSE induziert werden konnte, wurden von nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen.

In diesem elektrischen Epilepsiemodell können drei unterschiedliche SSSE-Typen unterschieden werden (BRANDT et al. 2003). Ein *fokaler* SSSE ist gekennzeichnet durch das kontinuierliche und ausschließliche Auftreten von Anfällen der Stadien I-II, begleitet von unregelmäßigen Anfällen des Stadiums III. Bei einem *fokalen SSSE mit einzelnen generalisierten Anfällen* können zusätzlich singuläre Anfälle der Stadien IV und V beobachtet werden. Bei einem generalisierten SSSE zeigen die Ratten

ununterbrochen generalisierte Anfälle, die zum Teil von Anfällen des Stadiums VI begleitet sein können.

4.1.4 Anfallsparameter

Die Bewertung der Anfallsstadien erfolgte basierend auf einer von (BARAN et al. 1995) modifizierten Skala (Tab. 2) von RACINE (1975). Die Beurteilung der Krampfschwere und Krampfdauer der epileptischen Anfälle erfolgte während der akuten Induktion eines SE.

Krampfschwere	Anfallscharakteristika	
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialklonus (Schließen des ipsilateralen Auges, stereotypes Schnüffeln)	Fokale Anfallsaktivität
Stadium II	schwerer Fazialklonus (klonische Kaubewegungen, Kopfnicken)	
Stadium III	unilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium IV	bilateraler Vorderextremitätenklonus und Aufrichten des Rumpfes	Generalisierte Anfallsaktivität
Stadium V	bilateraler Vorderextremitätenklonus mit Verlust der Stellreflexe (nach hinten fallen)	
Stadium VI	Stadium V mit explosionsartig einsetzendem Rennen und Springen (running und bouncing)	

Tab. 2: Skala der Krampfstadien (BARAN et al. 1995)

4.1.5 Mimetische Peptide

Die mimetischen Peptide wurden von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. E. Bock (Protein Laboratory, Inst. of Molecular Pathology, School of Medicine, University of Copenhagen, Denmark) zur Verfügung gestellt. Sowohl die Herstellung des NCAM-mimetischen Peptides Plannexin, als auch der Erythropoetin-mimetischen Peptide Epotris und Epobis erfolgte unverpackt.

4.1.6 Histologische Gewebeaufbereitung

Perfusion

Zur Perfusionsfixierung wurden die Tiere zunächst mit 500 mg/kg Chloralhydrat i.p. narkotisiert. Bei der Perfusionsfixierung wird das natürliche Gefäßsystem des Körpers für eine schnelle Fixierung des Gewebes verwendet. Hierfür wurde eine Knopfkanüle vom linken Herzventrikel in die Aorta geschoben. Das rechte Herzhorn wurde aufgeschnitten, um den Abfluss des Blutes und der Perfusionslösung zu erlauben. Der gleichbleibende Perfusionsdruck wurde durch eine geeignete Höhenpositionierung der Flaschen mit der Perfusionslösung bestimmt. Dieser entsprach ungefähr dem Blutdruck des Tieres. Bevor das Fixans verwendet wurde, ist der Blutkreislauf der Ratte mit 0,01 M phosphatgepufferter 0,9%iger Kochsalzlösung (pH-Wert 7,6) gespült worden. Zur Fixierung wurde ein 1:1 Gemisch aus 8%igem Paraformaldehyd in 0,2 M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,6) mit einer Temperatur von 4°C verwendet. Nach der Perfusion wurden die Gehirne entnommen und in eine 30%ige Saccharoselösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH-Wert 7,6) überführt. In dieser Saccharoselösung verblieben die Gehirne für mindestens drei Tage, um einen ausreichenden Gefrierschutz zu gewährleisten. Die Protokolle zur Herstellung der Pufferlösungen und des Fixans sind im Kapitel 10.2 aufgeführt.

Herstellung der Gefrierschnitte

Die coronalen Gehirnschnitte wurden an einem Kryostaten (HM560M, Microm International GmbH, Walldorf) angefertigt. Hierzu wurde das perfusionsfixierte Gehirn aufgefroren und es wurden 40 µm dicke coronale Serien angefertigt. Geschnitten wurde bei einer Objekttemperatur von etwa -25°C und einer Messertemperatur von -22°C. Die hergestellten Gehirnschnitte wurden zunächst in 0,1 M Phosphatpuffer aufgefangen und anschließend in Gefriermedium überführt. Im Anschluss an eine 24-stündige Lagerung bei -20°C wurden die Schnittserien bei -80°C aufbewahrt.

4.1.7 Immunhistochemische Färbemethoden

Die Durchführung immunhistochemischer Färbemethoden dient dazu, verschiedene anfallsinduziert hervorgerufene Veränderungen auf neuronaler Ebene darzustellen. Hierzu gehören neben einer Neubildung von Neuronen auch neurodegenerative Prozesse. Das Ausmaß anfallsinduziert stattfindender Veränderungen wurde in dieser Arbeit für unterschiedliche Gehirnregionen erfasst.

Nissl-Färbung

In Addition zu den immunhistochemischen Färbungen wurden ferner Gehirnschnitte mittels der Nissl-Färbemethode gefärbt. Hierzu wurde der Farbstoff Thionin verwendet. Die Nissl-Färbung eignet sich besonders zur Darstellung der Somata von Neuronen. Im Vergleich zu Gliazellen besitzen Neurone eine große Menge an Nisslschollen (Stapel endoplasmatischen Retikulums), die durch die Nissl-Farbstoffe selektiv angefärbt werden. Dies ermöglicht die Differenzierung von Neuronen und Gliazellen.

Immunhistochemische Nachweismethoden

Der Nachweis neuronaler Vorläuferzellen und ausdifferenzierter, postmitotischer Neurone erfolgte mittels poly- und monoklonaler Antikörper. Der Nachteil polyklonaler Antikörper liegt in ihrer zum Teil geringeren Spezifität im Vergleich zu der monoklonaler, aus B-Zellklonen stammender, Antikörper. Dies rührt daher, dass polyklonale Antikörper, die aus verschiedenen B-Lymphozyten abstammen, an mehrere Epitope (Bindungsstellen) der Proteine binden. Der Vorteil von polyklonalen Antikörpern ist hingegen, dass bei Maskierung oder Zerstörung eines Epitops der Nachweis des Proteins weiterhin durchführbar ist.

Standardprotokoll

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden im "Free-floating"-Verfahren durchgeführt. Die 40 µm dicken Gehirnschnitte wurden nach folgendem Standardprotokoll gefärbt. Anfänglich wurden die Schnitte sorgfältig in 0,05M Tris-gepufferter Natriumchloridlösung gewaschen (TBS; pH-Wert 7,6). Da es auf Grund der Formalinfixierung zu einer Beeinträchtigung der Immunreaktivität kommen kann, wurde in einem ersten Schritt eine Antigen-Demaskierung vorgenommen. Hierzu wurden die Schnitte für 60 Minuten in Natrium-Citratpuffer (pH-Wert 9) bei 95°C verbracht. Nach erneutem Waschen mit TBS wurde dann mittels 0,5 %igem H₂O₂ im folgenden die endogene Peroxidaseaktivität zerstört. Eine anschließende 60-minütige Inkubation der Schnitte in einer Blocklösung (2% bovines Serumalbumin, 0,3% Triton X-100, und 5% Serum der Tierart aus der der sekundäre Antikörper stammt) diente der Verhinderung unspezifischer Reaktionen der Antikörper. Direkt nach diesem Blocking-Schritt wurden die Schnitte für ungefähr 12h bei 4°C in das primäre Antiserum verbracht. Am nächsten Tag erfolgte nach sorgfältiger Spülung

mit TBS eine 60-minütige Inkubation mit dem, mit biotinmarkierten sekundären Antiserum. Durch ein erneutes mehrmaliges Spülen mit TBS im Anschluss hieran wurden ungebundene sekundäre Antikörper entfernt. Als letzter Schritt erfolgt eine 90-minütige Behandlung mit Streptavidin-Meerettich-Peroxidase (HRP, 1:375; DAKO), die die Inkubation beendete. Ein erneutes Spülen mit TBS beseitigte überschüssige Meerettich-Peroxidase. Die Sichtbarmachung der Antikörper erfolgte mittels einer schwermetallverstärkten 3,3'-Diaminobenzidinreaktion. Hierzu wurden die Gehirnschnitte in eine Diaminobenzidin-Reaktionslösung verbracht (0,05% 3,3'-Diaminobenzidin, 0,6% Ammonium-Nickel-Sulfat, 0,01% H₂O₂ gelöst in 0,5 M TBS). Nach 15 min wurde diese Reaktion durch ein mehrmaliges Spülen mit TBS beendet. Die Schnitte wurden auf entfettete Objektträger aufgezogen, getrocknet, dehydriert und mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 3 angegeben.

primäre Antikörper	Hersteller	Konzentration	sekundärer Antikörper	Hersteller	Konzentration
polyklonaler Ziegen-anti-DCX	Santa Cruz	1:300	polyklonaler Esel-anti-Ziege	Jackson Immuno Research, USA	1:500
monoklonaler Maus-anti-NeuN	Millipore, Hofheim	1:500	polyklonaler Kaninchen-anti-Maus	DAKO, Hamburg	1:500

Tab. 3: Bei immunhistochemischen Untersuchungen verwendete primäre und sekundäre Antikörper

4.1.8 Auswertung und Statistik

Auswertungen

Alle immunhistochemischen Auswertungen wurden verblindet durchgeführt. Die Schnittebenen, die für die Auswertung der Gehirnregionen herangezogen wurden, wurden nach PAXINOS und WATSON (2005) definiert.

Bestimmung der Neuronenzahl anhand der Anzahl NeuN-positiver Neurone

Die Quantifizierung der Neuronenzahl anhand der Anzahl NeuN-positiver Neurone basierte auf einer Neuronen-spezifischen immunhistochemischen Färbung (NeuN-Färbung = Kernfärbung für Neurone). Die Neuronenzählung erfolgte im Hilus des Gyrus Dentatus (GD) für drei verschiedene Schnittebenen relativ zu Bregma: -2,1 mm; -3,3 mm; -4,8 mm. Vor jeder Zählung wurde in einem ersten Schritt die Fläche des Hilus bestimmt. Als Begrenzung des Hilus wurden zum einen die Körnerzellen des GD definiert, zum anderen die Enden der Körnerzellschicht des GD jeweils mit der Spitze der CA₃-Region verbunden und als weitere Begrenzung definiert (GORTER et al. 2001). Zur Zählung der Neurone wurde der Hilus zunächst bei 40facher Vergrößerung eingelesen und im Weiteren die hilaren Neurone mit Hilfe einer computergestützten Bildanalysesoftware im Hilus des GD (s.o.) gezählt. Das System bestand aus einem Olympus BH2-Mikroskop mit einer Plan-Neofluar Linse (Zeiss, Germany), einer digitalen Farbkamera (single chip charge coupled device, CCD, Axiocam, Zeiss, Göttingen) und einem AMD Athlon™ Computer mit einem 64er-Rechenprozessor, der mit einer „image capture interface card“ bestückt war (Axiocam MR Interface Rev. A; Göttingen). Die Auswertung erfolgte mit der Bildanalysesoftware AxioVision (Windows Release 3.0, Carl Zeiss Vision). Die Anzahl der Neurone pro Quadratmillimeter ergab sich aus der Anzahl hilarer Neurone pro Ebene dividiert durch die gemessene Fläche (GORTER et al. 2001).

Bestimmung der Anzahl thioningefärbter Neurone und neuronaler Vorläuferzellen mittels der "optical fractionator" Methode

Die Quantifizierung thioningefärbter Neurone und DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen erfolgte mit der computergestützten Bildanalysesoftware StereoInvestigator 6.0 (Microbrightfield Europe, Magdeburg). Das hierfür erforderliche System bestand aus einem Leica DMLB-Mikroskop (Leica, Bensheim) mit einer Plan-Neofluar Linse (Leica, Bensheim), einer digitalen Farbkamera (single

chip charge coupled device, CCD, CX9000, Microbrightfield Europe, Magdeburg) und einem AMD Athlon™ Computer mit einem 64er-Rechenprozessor. Die Zählung der Zellen erfolgte stereologisch mit der sogenannten „optical fractionator“ Methode (WEST et al. 1991). Diese stereologische Zählmethode ist dazu geeignet die absolute Zahl an Neuronen bzw. neuronalen Vorläuferzellen in diversen Gehirnbereichen unbeeinflusst von deren Größe, Form und Orientierung oder einer jedweden Schrumpfung oder Schwellung des Gewebes abzuschätzen (Abb. 8). Wie bei der Schätzung großer Zellzahlen eines Gehirnareales üblich, werden auch bei der "optical fractionator" Methode aus der Gesamtheit der Zellen Proben genommen, deren Zellzahl exemplarisch gezählt wird. Die gezählte Zellzahl wird im Anschluss auf das gesamte Areal extrapoliert. Die Besonderheit der "optical fractionator" Methode ist, dass die zu zählende Probe dreidimensional und nicht zweidimensional ist, und so eine Aussage über die Zellzahl pro Volumeneinheit erlaubt.

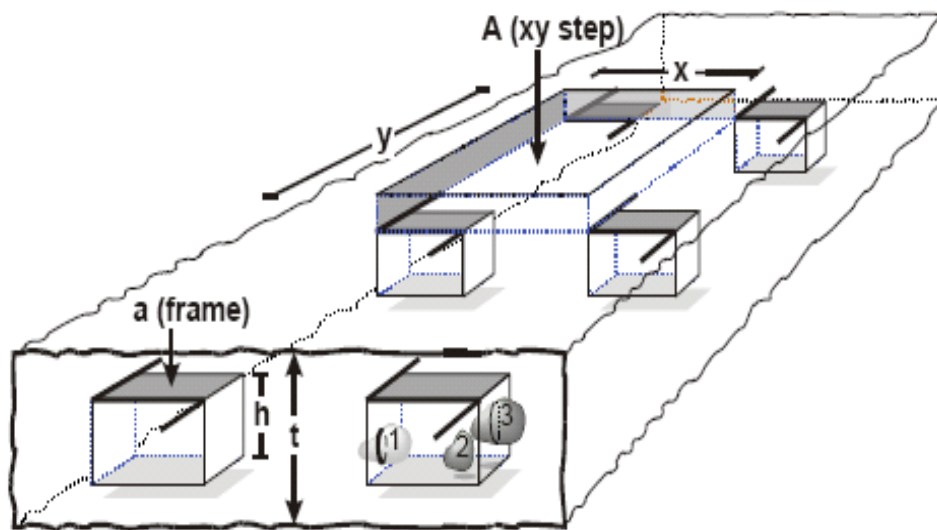


Abb. 8: Schematische Darstellung des Prinzips der „optical fractionator“ Methode, mit systemischer Verteilung sechs sogenannter „optical disector“ in einem Präparat der Höhe t . Zu beachten ist, dass der "optical disector" im Volumen des Schnitts schwebt und so von der unregelmäßig dargestellten Präparatoberfläche nicht beeinträchtigt wird (VOLLMANN-HONSDORF 2001).

Diese dreidimensionale Probe innerhalb der nach festgelegten Regeln quantifiziert wird, ist der „optical disector“ (Abb. 9). Die Auszählung der Zellzahl erfolgte in Anlehnung an das optimierte und effiziente „optical fractionator“ Zählschema der Ratte (WEST et al. 1991). Mit dem Ziel bei der Quantifizierung der Zellzahl einen möglichst ausgedehnten Bereich des relevanten Gehirnggebietes auswerten zu können wurden pro Tier und Seite jeweils sechs Schnitte von gleichmäßigen Intervallen von einer unbeteiligten Person ausgezählt.

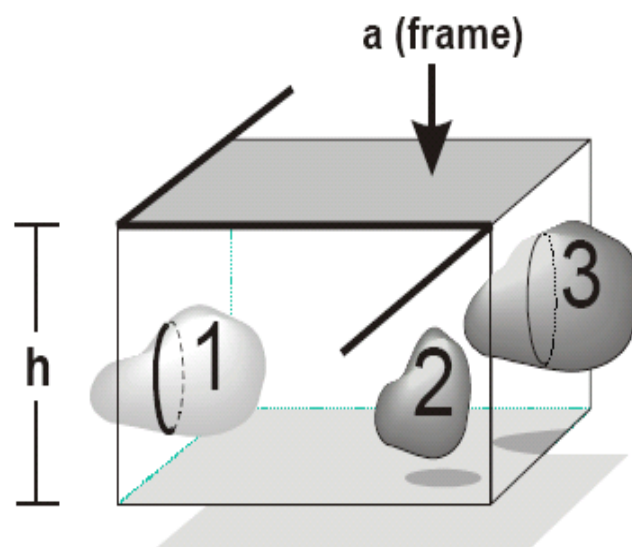


Abb. 9: Schematische Darstellung eines „optical disector“ (vergrößert aus Abb. 8). Die die Fläche a (frame) begrenzenden dicken, schwarzen Linien sind die so bezeichneten Ausschlusslinien (= „exclusion lines“), die ein Zählen von Zellen bei Berührung ausschließen. Für die abgebildeten beispielhaft positionierten Zellen 1, 2 und 3 bedeutet dies: Zelle 1 wird nicht gezählt, da es von einer „exclusion line“ durchschnitten wird. Zelle 2 liegt vollständig im Kubus und wird deshalb eindeutig gezählt. Zelle 3 liegt zwar nicht vollständig im frame, wird aber von keiner „exclusion line“ berührt und deshalb ebenfalls gezählt (VOLLMANN-HONSDORF 2001).

Score-System der Neurodegeneration in den Ammonshornregionen des Hippocampus

Neurodegenerative Veränderungen im Bereich des Cornu Ammonis (Ammonshorn, CA) wurden mittels eines Score-Systems erfasst. Hierbei wurden die CA₁-, CA_{3a}- und CA_{3b/4}-Region differenziert voneinander bewertet.

Score-System:

0	keine offensichtlichen Läsionen
1	eventuelle Läsionen (< 20% der Neuronen)
2	Läsionen mit Einbezug von 20-50% der Neuronen
3	Läsionen mit Einbezug von > 50% der Neuronen

Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4 und 5 für Windows durchgeführt. Die Angabe der Daten erfolgt als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean, Standardfehler). Zu Beginn wurde zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov Test geprüft, ob sich die vorliegenden Daten entsprechend einer Normalverteilung nach Gauß verhalten. Für den Vergleich von zwei Stichproben bei Vorliegen parametrischer Daten wurde der Student's t-test angewendet. Bei Vorliegen nicht parametrischer Daten (z.B. alle über ein Score-System ermittelten Daten) wurde ein Mann-Whitney U-Test angewendet. Für den Vergleich von vier oder mehr Stichproben wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse gerechnet. Bei nicht parametrischen Daten wurde die Kruskal-Wallis Varianzanalyse angewendet. Für den Vergleich der Mortalität zwischen den mit mimetischen Peptiden behandelten SE-Ratten und den Vehikel behandelten SE-Tieren wurde der Fisher's Exact Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Prinzipiell wurden alle statistischen Berechnungen zweiseitig durchgeführt. Allein wenn basierend auf der bekannten Literatur oder eigener Daten eine Veränderung der Daten nur in eine Richtung zu erwarten war, wurde einseitig getestet.

4.1.9 Versuchsdesign

Chemisches SE-Modell

Die Aufteilung der Tiere erfolgte in vier Gruppen: Die Ratten der Gruppe 1 (n=9) und der Gruppe 2 (n=16) wurden über vier aufeinander folgende Tage jeweils morgens und abends mit der Vehikellösung Aqua dest. behandelt. Am Morgen des fünften Versuchstages erhielten die Tiere eine weitere subkutane Injektion. Die Ratten der Gruppe 3 (n=19) und 4 (n=7) wurden zeitgleich zu den Vehikelbehandlungen der Tiergruppen 1 und 2 jeweils mit einem der beiden mimetischen Peptide Epotris (Gruppe 3) bzw. Plannexin (Gruppe 4) behandelt. Die Induktion eines SSSE durch das Chemikonvulsivum Pilocarpin bei Tieren der Gruppe 2, 3 und 4 erfolgte am dritten Behandlungstag. Dieser wurde nach 90 min mit Diazepam abgebrochen. Ungefähr 60 Minuten nach der letzten Epotris- bzw. Plannexin-Behandlung am fünften Versuchstag wurden die Tiere für immunhistochemische Untersuchungen perfundiert. Die Abbildung 10 gibt den zeitlichen Verlauf des Versuches wieder.

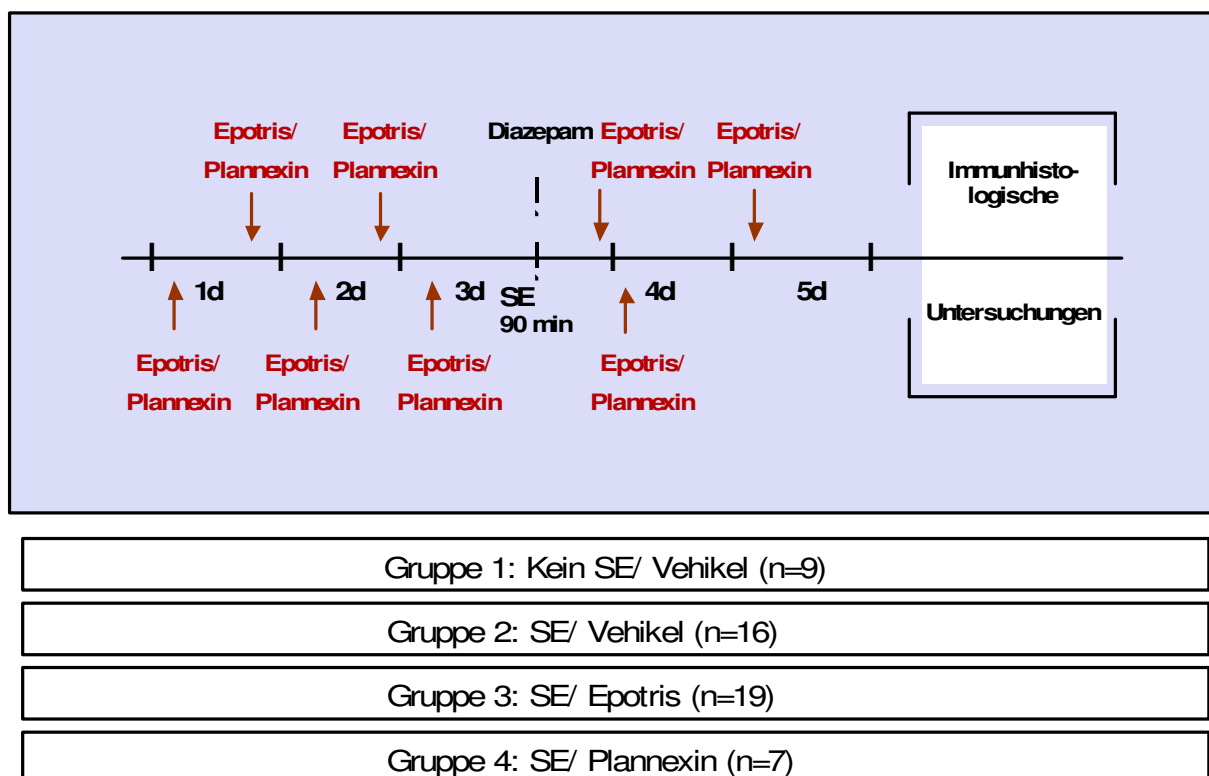


Abb. 10: Chemisches SE-Modell: Versuchsdesign und zeitlicher Verlauf

Elektrisches SE-Modell

Im Anschluss an die Elektrodenimplantation wurden die Ratten in sechs Tiergruppen eingeteilt. Ratten der Gruppe 4 (n=8) wurden 48h, 24h und 2h vor sowie 24h und 48h nach Statusinduktion mit dem mimetischen Peptid Epotris behandelt. Zeitgleich wurden Tiere der Gruppe 3 (n=6) ebenfalls mit Epotris behandelt. Diese Tiere wurden allerdings lediglich einer Schein-Stimulation unterzogen. Tieren der Gruppe 6 (n=8) wurden zu oben genannten Zeitpunkten das mimetische Peptid Epobis s.c. injiziert. Als Kontrollgruppe (Schein-Stimulation, aber Behandlung mit Epobis) dienten Tiere der Gruppe 5 (n=6). Tiere der Gruppe 1 (kein SE, n=7) und Gruppe 2 (BLA-Dauerstimulation, n=8) wurden mit Vehikellösung Aqua dest. behandelt. Zwei Stunden nach der dritten Behandlung wurde bei den Tieren der Gruppen 2,4 und 6 ein SSSE durch eine Dauerstimulation der BLA induziert. Dieser wurde nach vier Stunden durch eine intraperitoneale Diazepam-Injektion abgebrochen. 48h nach Induktion des SE wurden die Tiere für immunhistochemische Untersuchungen perfundiert (Abb. 11).

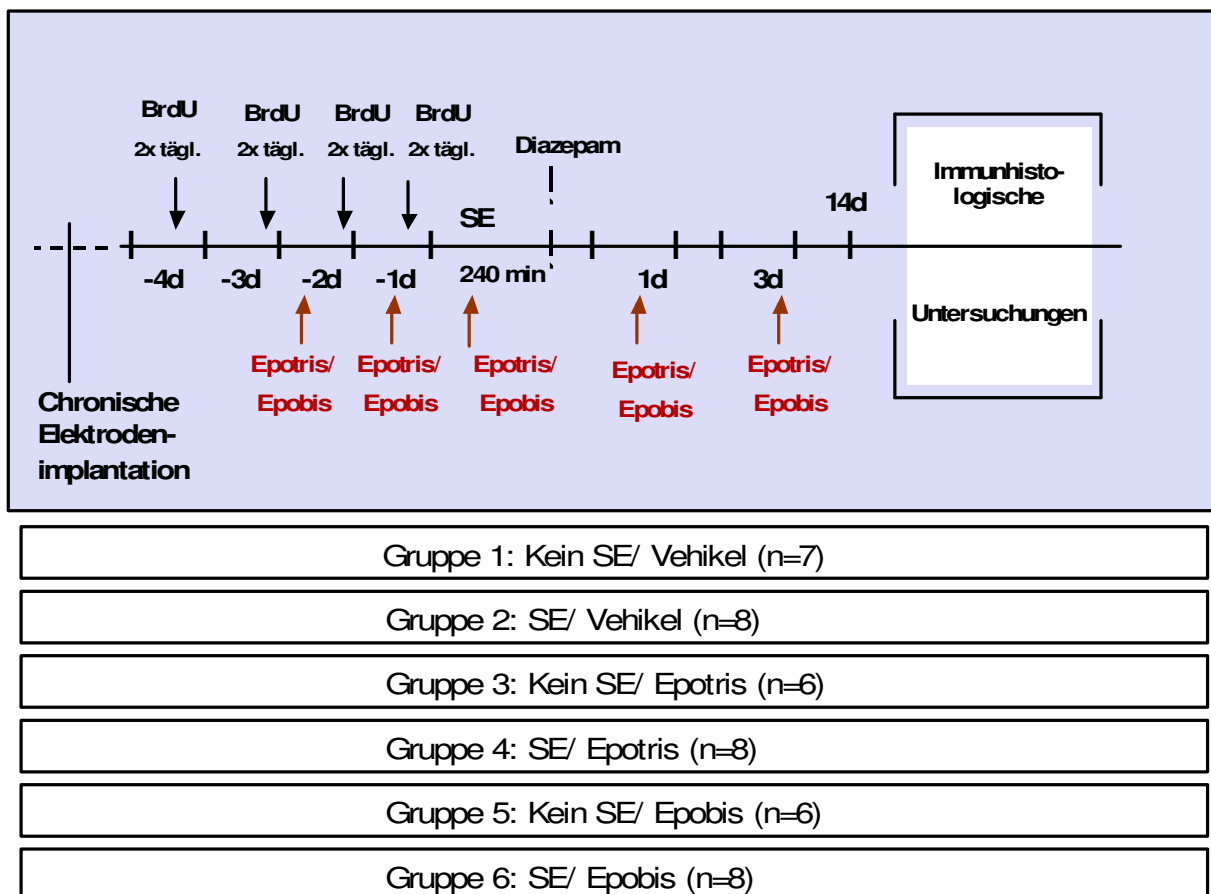


Abb. 11: Elektrisches SE-Modell: Versuchsdesign und zeitlicher Verlauf

4.2 MODIFIKATION DER PGP-EXPRESSION MITTELS RNA-INTERFERENZ

4.2.1 Versuchstiere

Die Versuche zur Modifikation der Pgp-Expression mittels RNA-Interferenz wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuches (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-39-07) an männlichen Balb/c Mäusen des Versuchstierzüchters Harlan Winkelmann, Borcheln durchgeführt. Die Tiere wurden in Gruppen von bis zu fünf Mäusen in Makrolonkäfigen Typ III gehalten. Im Weiteren erfolgte die Haltung der Mäuse analog zu der bereits beschriebenen Rattenhaltung. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung wogen die Mäuse 18-23 g. Zur Vermeidung circadianer Einflüsse wurden die Versuche immer zwischen 7:00 und 9:00 MEZ begonnen.

4.2.2 siRNA

Die für die Untersuchungen verwendete synthetische siRNA wurde kommerziell erworben (IBA GmbH, Göttingen). Die Sequenzen der anti-Pgp siRNA-Moleküle, wurden in Anlehnung an die Arbeit von MATSUI et al. (2005) ausgewählt (Tab. 4). Während die siRNA-Sequenz site 10m sowohl gegen *mdr1a*- als auch *mdr1b*-Pgp gerichtet ist, wird durch siRNA site 5m nur die Expression von *mdr1a*-Pgp inhibiert. Die Gruppe von MATSUI et al. zeigte für die eingesetzten siRNA-Sequenzen *in vitro* eine signifikante Inhibition der Pgp-Expression.

	Sequenz	zielgerichtet gegen
site 5m	AAU GUU GUC UGG ACA AGC ACU TT	<i>mdr1a</i>
	TT UUA CAA CAG ACC UGU UCG UGA	
site 10m	GGC CGC ACC UGC AUU GUG AUC TT	<i>mdr1a</i> und <i>mdr1b</i>
	TT CCG GCG UGG ACG UAA CAC UAG	

Tab. 4: Sequenzen der verwendeten siRNAs

Die Herstellung der Liposomen erfolgte durch Vittorio Zirolì (KTB Tumorforschungsgesellschaft GmbH, Arbeitsgruppe Massing, Freiburg). Für einen Verpackungsansatz wurden 18 mg einer Mischung aus

MPEG-DSPE (N-(carbonylmethoxypolyethylenglycol 2000)-1,2 distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), EPC-3 (hydrogenated egg PC) und Cholesterol (Sigma) (65/32/3 mol %) in 500 µl Ethanol gelöst und in eine Glasphiole verbracht. Das organische Lösungsmittel wurde unter einem konstanten Stickstoffstrom entfernt. Der verbleibende Lipidfilm wurde über Nacht bei Raumtemperatur vakuumgetrocknet. 50 µl einer siRNA-PBS-Lösung wurden hinzu gegeben und die Phiolen verschlossen. Es folgte eine fünfminütige Inkubationszeit, in der die Phospholipide bei Raumtemperatur rehydrieren und quellen konnten. Die Lipid-si-RNA-Mischung wurde anschließend mittels einer Zentrifuge homogenisiert. Nicht eingeschlossene siRNA wurde durch Filtration abgetrennt. In der nachstehenden Übersicht (Tab. 5) wird aufgezeigt, in welcher Form die siRNAs zum Einsatz gekommen sind.

4.2.3 Intravenöse Applikation der siRNA

Bei allen Untersuchungen zur Modifikation der Pgp-Expression mittels RNA-Interferenz wurde den Tieren die siRNA intravenös in die Schwanzvene appliziert.

Intravenöse Applikation unverpackter siRNA

Bei den Untersuchungen mit unverpackter siRNA, wurde diese zur Sicherstellung einer effizienten „drug delivery“ intravenös mittels der hydrodynamischen Methode appliziert. Hierfür wurden die Tiere mit Hilfe eines 'Restrainers' fixiert. Der Mäuseschwanz wurde vor dem Applikationsvorgang für etwa 30 sek in warmes (ca. 38°C) Leitungswasser gehalten, um eine lokale Gefäßweite zu erzeugen. Nach Abtrocknung des Schwanzes wurde dieser von einer Hilfsperson gestaut und die siRNA intravenös in die Schwanzvene appliziert. Dabei wurde die zu applizierende siRNA in ein Gesamtvolumen von 1,6 ml NaCl verbracht und innerhalb von kürzester Zeit (max. 5 sek.) injiziert.

Intravenöse Applikation der in carrierverpackten siRNA

Die in carrierverpackte siRNA wurde ebenfalls intravenös appliziert. Für diese Versuche wurden die Tiere wie oben beschrieben fixiert und die in Liposomen verpackte siRNA bzw. die Leerliposomen in 0,5 ml NaCl intravenös in die Schwanzvene appliziert.

Gruppe	Tier- zahl	Art der siRNA	Dekapitations- zeitpunkt nach letzter Applikation [h]	Dosierung pro Maus [µg]	Applikations- volumen [ml]	Anzahl der Applikationen/ Zeitraum der Behandlung
Gruppe 1	n=9	unverpackt (site 5)	24	50	1,6	2/ 2 Tage
	n=9	unverpackt (site 10)	24	50	1,6	2/ 2 Tage
	n=12	/	24		1,6	2/ 2 Tage
Gruppe 2	n=9	in Liposomen (site 5)	24	31	0,65	2/ 2 Tage
	n=8	in Liposomen (site 10)	24	31	0,65	2/ 2 Tage
	n=7	/	24		0,65	2/ 2 Tage
Gruppe 3	n=13	site 5	24	62,5	1,6	4/ 4 Tage
	n=13	/	24		1,6	4/ 4 Tage

Tab. 5: Übersicht über die in den verschiedenen Ansätzen verwendeten siRNAs und deren Konzentrationen

4.2.4 Histologische Gewebeaufbereitung

Dekapitation

Die Mäuse wurden 24h nach der letzten siRNA-Applikation dekapitiert. Nach Entfernung der Kopfhaut wurde der Schädel der Tiere mit einer gebogenen Schere und einer Knochenzange unter Schonung des unfixierten Gehirngewebes eröffnet. Die Gehirnnerven wurden durchtrennt und das unfixierte Gehirn vorsichtig unter zu Hilfenahme einer Pinzette aus der Schädelkalotte präpariert. Die Gehirne wurden mittels eines Skalpells halbiert. Die rechte Gehirnhälfte wurde dann unverzüglich in mit Einbettmedium (Tissue Freezing Medium der Firma Jung, Nussloch) gefüllte Zylinder aus Aluminiumfolie verbracht und vollständig mit dem Einbettmedium bedeckt. Zum Tiefgefrieren wurden die Aluminiumzylinder für einige Minuten in gekühltes 2-Methyl-butan gestellt, das mittels flüssigen Stickstoffs auf eine Temperatur von ca. -80 °C gebracht worden war. Das eingefrorene Gewebe wurde dann bis zur Weiterverarbeitung mit dem Kryostaten bei -80 °C aufbewahrt.

Organgewinnung

Für die Quantifizierung der Pgp-Expression mittels Western Blot und Real-Time PCR wurde die linke Gehirnhälfte verwendet sowie zusätzlich Organproben von Leber, Lunge, Niere und Hoden entnommen.

Herstellung der Kryostatschnitte

Ein Kryostat (HM560M, Microm International GmbH, Walldorf) diente zur Anfertigung der 14 µm dicken coronalen Gehirnschnitte. Geschnitten wurde bei einer Objekttemperatur von -20°C und einer Messertemperatur von -22°C. Die hergestellten Schnittpräparate wurden auf Objektträger (Histobond) aufgenommen und sogleich eingefroren. Alle Schnitte wurden bis zur immunhistochemischen Färbung bei -80°C gelagert.

4.2.5 Immunhistochemische Färbemethoden

Mit der Methode der Immunhistochemie soll in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob mittels intravenöser Applikation Pgp-spezifischer siRNA eine Veränderung der Expression des Multidrug-Transporters Pgp in verschiedenen Gehirnregionen erreicht werden kann.

Immunhistochemischer Nachweis von P-Glycoprotein

Der Expressionsnachweis von Pgp in den 14 µm dicken Kryostatschnitten wurde nach einem etablierten Protokoll zum Nachweis von Pgp im Mäusegehirn durchgeführt. Die Pgp-Expression wurde hierbei mittels eines polyklonalen Ziegenantikörpers (1:30, Santa Cruz, USA) nachgewiesen. Schnitte der Ebene -1,3 mm und -1,7 mm relativ zu Bregma (FRANKLIN u. PAXINOS 2004) wurden immunhistochemisch gefärbt. Um die methodisch bedingte Varianz in der Farbintensität möglichst gering zu halten, wurden alle zu vergleichenden Gehirnschnitte der immunhistochemischen Färbung zeitgleich und mit denselben Lösungen unterzogen. Dadurch konnte die Farbintensität später verglichen werden. Nach einer anfänglichen sechsstündigen Trocknung der Schnitte bei Raumtemperatur wurden diese in einem ersten Schritt für 8 min in Acetonlösung bei Raumtemperatur demaskiert. Nach einer erneuten 14-stündigen Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte am nächsten Tag zunächst dreimal sorgfältig in 0,05 M TBS (pH 7,6) gewaschen. Die Zerstörung der endogenen

Peroxidaseaktivität wurde durch eine nachfolgende 30-minütige Inkubation mit 0,5%igem H_2O_2 vorgenommen. Nach erneutem sorgfältigem Spülen mit TBS erfolgte dann ein „Cover Plates“-vermitteltes Einspannen der Objektträger in eine Immunhistoapparatur (Shandon Sequenza). Die Schnitte wurden mit TBS erneut gespült und anschließend für 60 min in einer Blocklösung (2% bovines Serumalbumin, 0,3% Triton X-100, und 5% Eselserum) inkubiert. Dieser Schritt dient der Verhinderung unspezifischer Reaktionen der Antikörper. Unmittelbar nach dem „Blocken“ wurden die Schnitte für ungefähr 12h bei 4°C in das primäre Antiserum (AK C19 1:30 in *Carrier solution*) verbracht. Am nächsten Tag erfolgte nach sorgfältiger Spülung mit TBS eine 90-minütige Inkubation in Biotin-gekoppeltem sekundärem Antiserum (Esel-anti-Maus, 1:200 in *Carrier solution*). Ungebundener sekundärer Antikörper wurde durch nachfolgendes mehrmaliges Spülen mit TBS entfernt. Zur Verstärkung der Farbreaktion erfolgt in einem letzten Schritt eine 90-minütige Behandlung mit Streptavidin-Meerettich-Peroxidase (HRP, 1:375; DAKO). Ein erneutes Spülen mit TBS beseitigt überschüssige Meerettich-Peroxidase. Für den eigentlichen Färbeschritt werden die Schnitte wieder vorsichtig aus den „Cover Plates“ entnommen, in eine Gondel verbracht und in einer Glas-Küvette erneut mit TBS gespült. Die Sichtbarmachung der Antikörper erfolgte mittels einer schwermetalverstärkten 3,3'-Diaminobenzidinreaktion. Hierzu wurden die Gehirnschnitte in eine Diaminobezidin-Reaktionslösung verbracht (0,05% 3,3'-Diaminobenzidin, 0,6% Ammonium-Nickel-Sulfat, 0,01% H_2O_2 gelöst in 0,5 M TBS). Nach 15 min wurde diese Reaktion durch ein mehrmaliges Spülen mit TBS beendet. Nach Spülen in Aqua bidest. konnten die Schnitte über Nacht an der Luft getrocknet werden und am nächsten Tag mit Eindeckmedium (Entellan) eingedeckt werden.

4.2.6 Quantifizierung der Pgp-Expression mittels Immunhistochemie

Messung der Fläche und der optischen Dichte

Die quantitative Erfassung der Pgp-Expression basiert auf einer Analyse der immunhistochemisch-markierten Fläche und der optischen Dichte (OD) der markierten Fläche. Im Rahmen einer früheren Ph.D.-Arbeit in der Arbeitsgruppe wurde für diesen Zweck ein computergestütztes Auswertsystem etabliert (VOLK et al. 2005). Das System besteht aus einem Olympus BH2-Mikroskop mit einer Plan-Neofluar Linse (Zeiss, Germany), einer digitalen Farbkamera (single chip charge coupled device, CCD, AxioCam, Zeiss, Göttingen) und einem AMD

Athlon™Computer mit einem 64er-Rechenprozessor, der mit einer „image capture interface card“ bestückt war (Axiocam MR Interface Rev. A; Göttingen). Die Gehirnschnitte wurden bei einer 40fachen Vergrößerung mittels der Bildanalysesoftware KS400 (Windows Release 3.0, Carl Zeiss Vision) ausgewertet. Die Kalibrierung der Längenmessung wurde mit einem geeichten Mikrometer durchgeführt. Vor jeder Messreihe wurde die Kamera für mindestens eine Stunde aufgewärmt, da die Temperatur der Kamera von entscheidender Bedeutung für das Signal-Rausch-Verhältnis und somit für den gesamten Prozess der Messung ist. Im Unterschied zu dem von (RIEUX et al. 2002) beschriebenen System, in dem Grauwerte erfasst und in OD umgerechnet werden, wurde bei den vorliegenden Untersuchungen die OD direkt gemessen. Ermöglicht wurde dies durch eine Kalibrierung des Systems mit einem OD-Standard (Calibration of Step Tablet No. 507ST101, Eastman Kodak Company, USA). Die Beleuchtungsstärke des Mikroskops konnte mittels des OD-Standards geprüft und dadurch konstant gehalten werden. Die eingelesenen Bilder wurden auf optische Distorsionen korrigiert („Shading correction“). Damit konnten Helligkeitsungleichheiten bei der Aufnahme ausgeglichen werden. Hierzu wurde ein Bild aus einem freien Bereich des Objektträgers (Hellfeld-Hintergrund) eingelesen und von den für die Messung eingelesenen Bildern abgezogen. Zur deutlichen Unterscheidung des positiven Pgp-Signals vom Hintergrundsignal musste für jede Messreihe in einem ersten Schritt ein Schwellenwert definiert werden. So wurde vermieden, dass der Hintergrund als positives Pgp-Signal gewertet wurden. Der Schwellenwert wurde im Bereich der zu messenden Region an mindestens drei Schnitten von durchschnittlicher Färbungsintensität und von verschiedenen Tieren derart festgelegt, dass er eindeutig von dem Hintergrundsignal abgrenzbar war (RIEUX et al. 2002). Für jede Messreihe einer bestimmten Gehirnregion wurde die Schwelle neu bestimmt und während der Messungen aller Schnitte für diese Region konstant beibehalten. Nur Pixel mit einer optischen Dichte über dem jeweilig festgelegten Schwellenwert wurden in die Auswertung miteinbezogen. Zur Hintergrundkorrektur der OD-Messung wurde der Bereich als Hintergrund definiert, der unterhalb des Schwellenwertes lag. Die mittlere OD des Hintergrundsignals wurde dann von der mittleren OD des Pgp-Signals abgezogen, um eine hintergrundkorrigierte OD des positiven Pgp-Signals zu erlangen. Die Pgp-Expression wurde bei jeder zu messenden Gehirnregion unilateral (rechts) und jeweils für die Schnittebenen -1,3 mm und -1,7 mm relativ zu Bregma

erfasst. Die gemessenen Gehirnregionen waren der parietale Cortex, der piriforme Cortex, der Hippocampus und der Hilus des Gyrus Dentatus. In den verschiedenen Versuchen war es nicht immer möglich alle genannten Regionen zu messen (s. Ergebnisteil). Je nach Region wurden 3-6 Messfelder gemessen. Die gemessene Fläche des positiven Pgp-Signals wurde relativ zur Gesamtgröße des Messfeldes angegeben.

4.2.7 Quantifizierung der Pgp-Expression mittels Polymerasekettenreaktion

Die Arbeiten zur Quantifizierung der Pgp-Expression auf mRNA-Ebene mittels Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. M. Uhr am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München durchgeführt. Bei der PCR handelt es sich um eine Methode, die der Amplifikation eines zwischen zwei gegenläufigen *Primern* gelegenen DNA-Abschnittes dient. Die *Primer* werden im Überschuss unter Hybridisierungsbedingungen zu denaturierender Ausgangs-DNA gegeben und verhelfen zur Gegenstrangsynthese durch eine hitzestabile Polymerase. Die so entstandenen DNA-Doppelstränge werden denaturiert und stellen die Ausgangsmatrize für eine erneute Gegenstrangsynthese dar. Durch die Wiederholung von 20-50 der beschriebenen Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Ziel-DNA-Abschnittes.

RNA-Isolierung, Aufreinigung und Umwandlung in cDNA

Bevor mit der PCR begonnen werden konnte, musste zunächst die Gesamt-RNA aus den Zellen des Gehirn- bzw. Lebergewebe isoliert werden. Dies wurde mittels einer so genannten *TriPure*-Reagenz durchgeführt. Diese Reagenz setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 1) Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, Conc.: 1 U/μl (Invitrogen)
enthält: DNase I, Amp Grade
10 x DNase I Reaction Buffer
25 mM EDTA (pH 8,0)
- 2) RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor, 40 U/μl (Invitrogen)
- 3) H₂O, PCR grade aus dem Kit von LC-FastStart DNA MasterHybridizationProbes (Roche)

In einem nächsten Schritt wurde die isolierte RNA von überschüssiger DNA befreit. Hierzu wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. 6,0 µl DNase-Behandlungsmix + 4 µl RNA (250ng/µl RNA)
6,0 µl DNase-Behandlungsmix + 1,5 µl RNA-Calibrator (650ng/µl) + 2,5 µl PCR Wasser
2. Mischen und 5 sec./800 RCF zentrifugieren
3. 15 min. bei 25 °C inkubieren + 1 µl 25mM EDTA-Solution (ph 8.0)
4. Mischen und 5 sec./800 RCF zentrifugieren
5. 10 min. bei 65 °C (Thermomixer) inkubieren
6. Mischen und 5 sec./800 RCF zentrifugieren

Daraufhin wurden die Proben auf Eis verbracht und abkühlt. Die Umschreibung der RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA wurde unmittelbar im Anschluss durchgeführt. Ansonsten wurden die Proben auf Trockeneis bzw. bei –80°C zwischengelagert.

Quantitative Real-Time PCR

In dieser Arbeit wurde zum Nachweis von Pgp-mRNA die Methode der quantitativen Real-Time PCR ausgewählt. Diese wurde mit Hilfe des LightCycler® 480 Systems (Roche Deutschland Holding GmbH Grenzach-Wyhlen) durchgeführt. Die eingesetzten Primer und Sonden sind in Tabelle 6, die LightCycler-Einstellungen sowie die Charakteristika der einzelnen Programm-Schritte in Tabelle 7 dargestellt.

Primer	Länge Basen-paare	Nucleotidsequenz 5'zu 3'
vorwärts	21	GCTGGAAGCTAACCCTTGTGA
rückwärts	24	ATAGATAAGGAGAAAAGCTGCACC
Sonde Fluoreszenz	26	AAGACTTCTTCAGCAACTGCTOCAGC
Sonde LightCycler	23	LCRed640- TTTGCATAAGCATGGAGTTCCTT

Tab. 6: Übersicht über die im Rahmen der Real-Time PCR eingesetzten Sonden und Primer

Programmname		Prä-Inkubation					
Zyklen		1		Analysis Mode		keine	
Ziel-Temperatur	Acquisition Mode	Dauer (h:m:s)	Ramp rate (°C/s)	Acquisitions (pro °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (Zyklen)
95 °C	keine	00:10:00	4,80		0	0	0

Programmname		Amplifikation					
Zyklen		45		Analysis Mode		Quantifizierung	
Ziel-Temperatur	Acquisition Mode	Dauer (h:m:s)	Ramp rate (°C/s)	Acquisitions (pro °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (Zyklen)
95 °C	keine	00:10:00	4,80		0	0	0
60 °C	single	00:10:00	2,50		0	0	0
72 °C	keine	00:10:00	4,80		0	0	0

Programmname		Schmelzen					
Zyklen		1		Analysis Mode		Schmelzkurve	
Ziel-Temperatur	Acquisition Mode	Dauer (h:m:s)	Ramp rate (°C/s)	Acquisitions (pro °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (Zyklen)
95 °C	keine	00:00:01	4,80		0	0	0
40 °C	keine	00:01:00	2,50		0	0	0
75 °C	fortlaufend		0,21	5	0	0	0

Programmname		Kühlen					
Zyklen		1		Analysis Mode		keine	
Ziel-Temperatur	Acquisition Mode	Dauer (h:m:s)	Ramp rate (°C/s)	Acquisitions (pro °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (Zyklen)
40 °C	keine	00:00:30	2,50		0	0	0

Tab. 7: Übersicht über die Programmeinstellungen und den Ablauf der einzelnen Programme bei einer Real-Time PCR-Standardreaktion mit dem LightCycler 480.

Ein Reaktionsansatz setzte sich für eine Probe folgendermaßen zusammen:

Reaktionsansatz: **9 µl Master-Mix + 1 µl cDNA**

Master Mix:

Komponente	Konz. Stock	Konz. in der Kapillare	µl / Reaktion	%	µl für...Proben
Wasser			2,00	20	2,40
Primer vorwärts	10	0,5	0,50	5	0,60
Primer rückwärts	10	0,5	0,50	5	0,60
Sonde LightCycler	4	0,2	0,50	5	0,60
Sonde Fluoreszenz	4	0,2	0,50	5	0,60
Enzym Mix	2	1	5,00	50	6,00
Gesamt:			10,00	100	12

Quantifizierung der Genexpression

Die Expression der Pgp codierenden Gene *mdr1a* und *mdr1b* wurde relativ quantifiziert. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens auf einen endogenen Standard, ein so genanntes nicht reguliertes Haushaltsgen (*Housekeeping gene*) bezogen. Dieser Vorgang wird auch als Normalisierung bzw. Standardisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet. Eine Standardisierung des gemessenen Signals ist insbesondere notwendig, um Messfehler bei der spektrophotometrischen Quantifizierung, Ungenauigkeiten beim Pipettieren oder einen RNA-Verlust beim Übertragen auf Membranen auszugleichen. Als endogener Standard dienten in dieser Arbeit die *Housekeeping gene* Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) und das TATA-binding Protein (*TBP*). Als Maß für die Quantifizierung der cDNA bzw. mRNA Startmenge wurde der so genannte *Crossing Point* (CP) herangezogen. Der CP entspricht der Anzahl an PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstantes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am CP befinden sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Ein um eine Einheit geringerer CP entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA bzw. mRNA Startmenge. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte letztendlich über die $\Delta\Delta CP$ Methode. Dabei wurde in einem ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CP Wert des Referenzgens vom CP Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta CP = CP \text{ Zielgen} - CP \text{ Referenzgen}$). Nach dieser Normalisierung wird vom ΔCP Wert der experimentell behandelten Probe der ΔCP einer Kontrolle abgezogen. Man kommt zum so genannten *delta-delta CT* ($\Delta\Delta CP$).

ΔCP = CP Zielgen - CP Referenzgen

$\Delta\Delta CP$ = ΔCP Behandlung - ΔCP Kontrolle

4.2.8 Auswertung und Statistik

Auswertungen

Alle immunhistochemischen Auswertungen wurden vom Experimentator verblindet durchgeführt. Die Schnittebenen, die für die Auswertung der Gehirnregionen herangezogen wurden, wurden nach FRANKLIN und PAXINOS (2004) definiert.

Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4 für Windows durchgeführt. Die Angaben der Daten erfolgte als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean, Mittelwertsfehler, Standardfehler). Zunächst wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test geprüft, ob sich die vorliegenden Daten entsprechend einer Normalverteilung nach Gauß verhalten. Für den Vergleich von zwei Stichproben bei Vorliegen parametrischer Daten wurde der Student's t-test angewendet. Bei Vorliegen nicht parametrischer Daten (z.B. alle über ein Score-System ermittelten Daten) wurde ein Mann-Whitney U-Test angewendet. Für den Vergleich von drei oder mehr Stichproben wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse gerechnet. Bei nicht parametrischen Daten wurde die Kruskal-Wallis Varianzanalyse angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Prinzipiell wurden alle statistischen Berechnungen zweiseitig durchgeführt. Allein wenn basierend auf der bekannten Literatur bzw. eigener Daten eine Veränderung der Daten nur in eine Richtung zu erwarten war, wurde einseitig getestet.

4.2.9 Versuchsdesign

4.2.9.1 ZWEITÄGIGE siRNA-BEHANDLUNG

Bei diesen Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze verfolgt. In einem ersten Ansatz wurde den Tieren in Liposomen verpackte siRNA intravenös mittels der hydrodynamischen Methode in die Schwanzvene appliziert. Vergleichend wurde unverpackte siRNA ebenfalls nach der hydrodynamischen Methode appliziert.

Applikation carrierverpackter siRNA

Der Effekt in Targeting ApoE4-Liposomen verpackter siRNA wurde im Mausmodell untersucht. Zu diesem Zweck wurden 24 männliche Balb/c Mäuse mit einem Gewicht von ungefähr 20 g verwendet. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: eine Kontrollgruppe (Applikation von Leerliposomen, $n=7$), eine 'site 5m'-Gruppe ($n=9$)

und eine 'site 10m'-Gruppe (n=9). Im folgenden wurde den Tieren an zwei aufeinander folgenden Tagen die in Liposomen verpackte siRNA intravenös im hydrodynamischen Verfahren appliziert. 24h nach der zweiten Applikation wurden die Mäuse für folgende immunhistochemische Untersuchungen dekapitiert.

Applikation unverpackter siRNA

Der Effekt der Applikation unverpackter siRNA wurde ebenfalls an männlichen Balb/c Mäusen mit einem Gewicht von etwa 20 g untersucht. Die 25 Tiere wurden in eine Kontrollgruppe (n=12), eine 'site 5m'-Gruppe (n=9) und eine 'site 10m'-Gruppe (n=9) aufgeteilt. Die Behandlung der Tiere mit unverpackter siRNA erfolgte in diesem Ansatz ebenfalls an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mittels der hydrodynamischen Methode. 24h nach der letzten Applikation wurden die Tiere zwecks der Durchführung immunhistochemischer Untersuchungen dekapitiert.

4.2.9.2 VIERTÄGIGE siRNA-BEHANDLUNG

Die Auswirkungen einer über vier Tage andauernden Applikation unverpackter siRNA-site 5m wurde ebenfalls an männlichen Balb/c Mäusen mit einem Gewicht von ungefähr 20 g untersucht. Die Tiere wurden in eine Kontrollgruppe (n=13) und eine siRNA-Gruppe (n=13) aufgeteilt. Die Tiere erhielten in diesem Ansatz an vier aufeinander folgenden Tagen jeden Morgen die zu verabreichende Menge siRNA in 1,6 ml NaCl-Lösung im hydrodynamischen Verfahren intravenös in die Schwanzvene injiziert. 24h nach der letzten siRNA wurden diese Tiere ebenfalls für folgende immunhistochemische Untersuchungen dekapitiert.

5 ERGEBNISSE

5.1 MODULATION ANFALLSINDUZierter NEURONALER VERÄNDERUNGEN DURCH MIMETISCHE PEPTIDE

Mit dem Ziel die Effekte einer Behandlung mit den mimetischen Peptiden Epotris, Epobis und Plannexin auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen eingehend zu untersuchen, wurden Studien in verschiedenen SE-Modellen durchgeführt. Es wurde sowohl das chemische fraktionierte Pilocarpin-Modell (Kap. 4.1.2) als auch das elektrische SE-BLA-Modell (Kap. 4.1.3) angewendet.

5.1.1 Chemisches SE-Modell

Die Studien zu den Auswirkungen der mimetischen Peptide Epotris und Plannexin im chemischen SE-Modell wurde an 64 weiblichen Wistarratten im fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Modell untersucht. Hierfür wurde bei 55 Tieren nach einer Vorbehandlung mit Lithiumchlorid das Parasympathomimetikum Pilocarpin in einer Dosierung von 10 mg/kg alle 25-30 min bis zur Auslösung eines generalisierten SE i.p. injiziert. Die Anzahl der Injektionen wurde auf maximal 12 limitiert. Die fraktionierte Pilocarpingabe führte bei 42 Tieren (=66% der Tiere) zu einem generalisierten SE (Tab. 8). Neunzig Minuten nach Beginn des SE wurde dieser durch eine Diazepam-Injektion abgebrochen, die gegebenenfalls bei anhaltender motorischer Anfallsaktivität im dreiminütigen Abstand in gleicher Dosierung bis zur kompletten Suppression der Anfallsaktivität wiederholt wurde. Für nachfolgende immunhistochemische Untersuchungen wurden die Tiere 48h später perfundiert. 50% der Tiere (n=21) mit generalisierter Krampfaktivität verstarben innerhalb der ersten 24h nach Unterbrechung des SE. Dabei zeigten sich in der Mortalität zwischen den einzelnen Tiergruppen keine signifikanten Unterschiede (Tab. 8). Während des gesamten Versuchsverlaufs, beginnend mit der ersten Pilocarpingabe wurden die Tiere durchgehend beobachtet. Das Verhalten der Tiere wurde schriftlich genauestens protokolliert. Erfasst wurden die Anzahl an Pilocarpininjektionen bis zur Auslösung eines generalisierten SE, die Zeitdauer bis zum ersten generalisierten Anfall sowie die Zeitdauer bis zum Beginn eines generalisierten SE. In allen Tiergruppen waren durchschnittlich drei bis vier Applikationen bis zur Ausbildung eines generalisierten SE notwendig (Tab. 8). Für die Latenzzeit bis zum ersten

generalisierten Anfall und für die Latenzzeit bis SE-Beginn zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen (Tab. 8).

	SE/ Epotris	SE/ Plannexin	SE/ Vehikel
Anzahl Tiere pro Gruppe	n=22	n=9	n=24
Anzahl Tiere mit generalisiertem SE	19	7	16
Durchschnittliche Anzahl an benötigten Pilocarpinapplikationen bis SE-Beginn	3,37 ± 0,36	3,57 ± 0,20	3,19 ± 0,23
Anzahl verstorbener Tiere mit generalisiertem SE/ Mortalität in %	10/ 53	2/ 29	9/ 47
Latenzzeit bis zum ersten generalisierten Anfall (min)	71,50 ± 7,41	80,00 ± 5,05	71,16 ± 9,01
Latenzzeit bis zur Manifestation eines generalisierten SE (min)	77,38 ± 7,08	80,57 ± 5,03	83,58 ± 10,73

Tab. 8: Übersicht über die Tierzahlen und Beobachtungsparameter im SE-Pilocarpin-Modell. Angegeben sind die Anzahl von Tieren pro Behandlungsgruppe, die Anzahl der Tiere mit generalisierter Krampfaktivität sowie die durchschnittlich benötigte Anzahl an Pilocarpin-injektionen bis zum Eintritt eines generalisierten SE. Weiterhin dargestellt ist die Anzahl verstorbener Tiere pro Tiergruppe und die Mortalität in %.

Histologie

Zur Beurteilung des Einflusses beider mimetischer Peptide auf anfallsinduzierte hippocampale Alterationen wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Zur Beurteilung der Neurogenese wurde eine Doublecortin-Färbung durchgeführt (Kap. 4.1.7). Das mikrotubulinassoziierte Protein Doublecortin (DCX) wird transient von neuronalen Vorläuferzellen des Hippocampus und des olfaktorischen Systems exprimiert. Basierend auf dieser neuronalen vorläuferzellspezifischen Expression des Proteins eignet sich DCX sehr gut als quantitativer Marker zum Nachweis einer adulten Neurogenese (RAO u. SHETTY 2004). Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung wurden DCX-positive gefärbte Zellen ausgezählt sowie morphologische Veränderungen der Dendriten dieser Zellen erfasst.

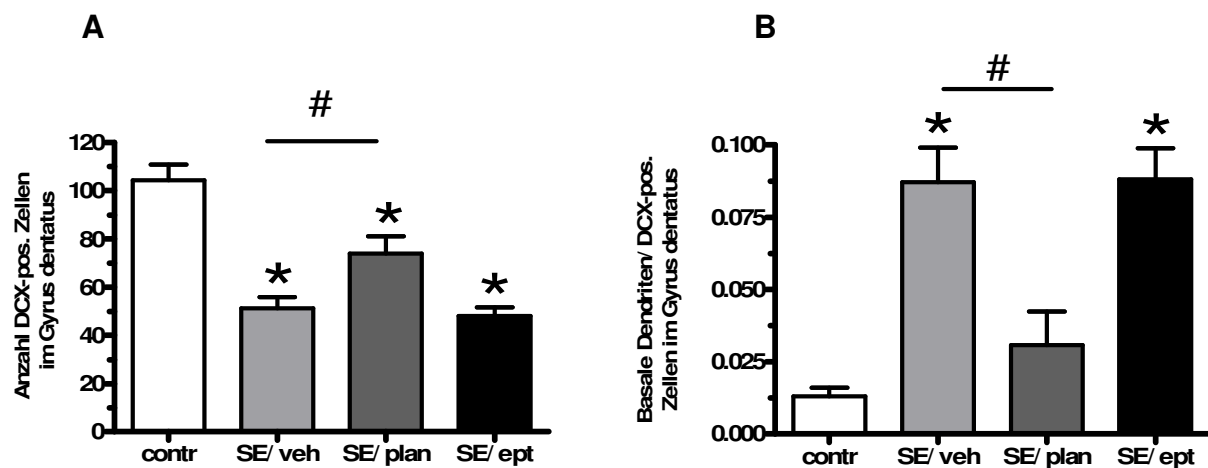


Abb. 12: Anzahl der DCX-positiven Zellen im Gyrus Dentatus des Hippocampus (A) und Anzahl DCX-positiver Zellen mit persistierenden basalen Dendriten (B) in den einzelnen Tiergruppen (Mittelwerte \pm SEM). Die Gesamtzahl DCX-positiver Zellen war bei Tieren mit Pilocarpin-induziertem SE im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant verringert. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der DCX-positiven Zellen mit basalen Dendriten außer in der Plannexin behandelten Gruppe bei allen Tieren mit Pilocarpin-induziertem SE signifikant erhöht.

Zwei Tage nach Induktion eines SE wiesen die Hippocampi von Tieren in denen ein SE induziert wurde, signifikant weniger DCX-positive Zellen auf als Kontrolltiere. Eine Behandlung mit dem mimetischen Peptid Plannexin wirkte einer anfallsinduzierten Reduktion der Anzahl DCX-positiver Zellen entgegen. Plannexin behandelte Tiere wiesen signifikant mehr DCX-markierte Zellen auf, als Vehikel behandelte Tiere (Abb. 12, A und 13). Im Weiteren wurden 48h nach Statusinduktion bei SE-Tieren, mit Ausnahme der Plannexin behandelten SE-Tiere, signifikant mehr persistierende basale Dendriten ausgezählt als bei Kontrolltieren. Plannexin behandelte Tiere wiesen signifikant weniger persistierende basale Dendriten auf als Vehikel behandelte Ratten (Abb. 12, B und 14). Eine Epotris-Behandlung führte verglichen mit Vehikel behandelten Tieren weder zu einer signifikanten Zunahme DCX-positiver Zellen noch zu einer Reduktion persistierender basaler Dendriten.

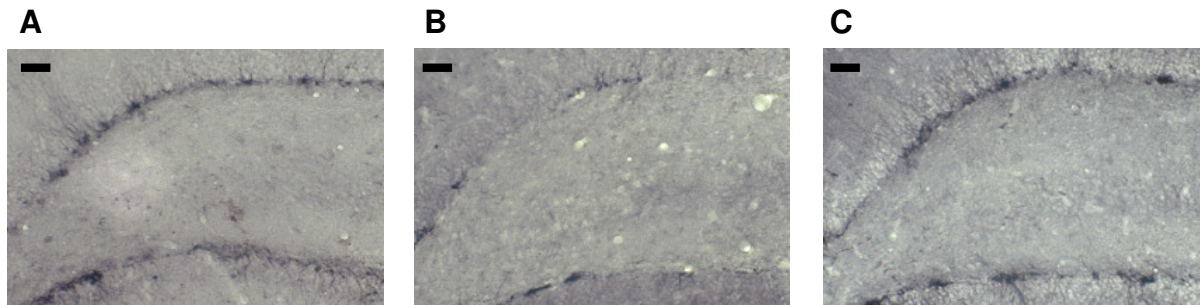


Abb. 13: Immunhistochemische Färbung des spezifischen Vorläuferzellproteins Doublecortin (DCX) im Hippocampus von einem Kontrolltier (A), einem Vehikel behandelten SE-Tier (B) und einem Plannexin behandelten SE-Tier (C). Tiere, mit generalisiertem SE wiesen signifikant weniger DCX-positive Zellen auf als Kontrolltiere. Eine Behandlung mit dem mimetischen Peptid Plannexin verhinderte partiell eine anfallsinduzierte Reduktion der Anzahl DCX-positiver Zellen. Plannexin behandelte Tiere wiesen signifikant mehr DCX-markierte Zellen auf, als Vehikel behandelte Tiere. Maßstabbalken = 50 μ m

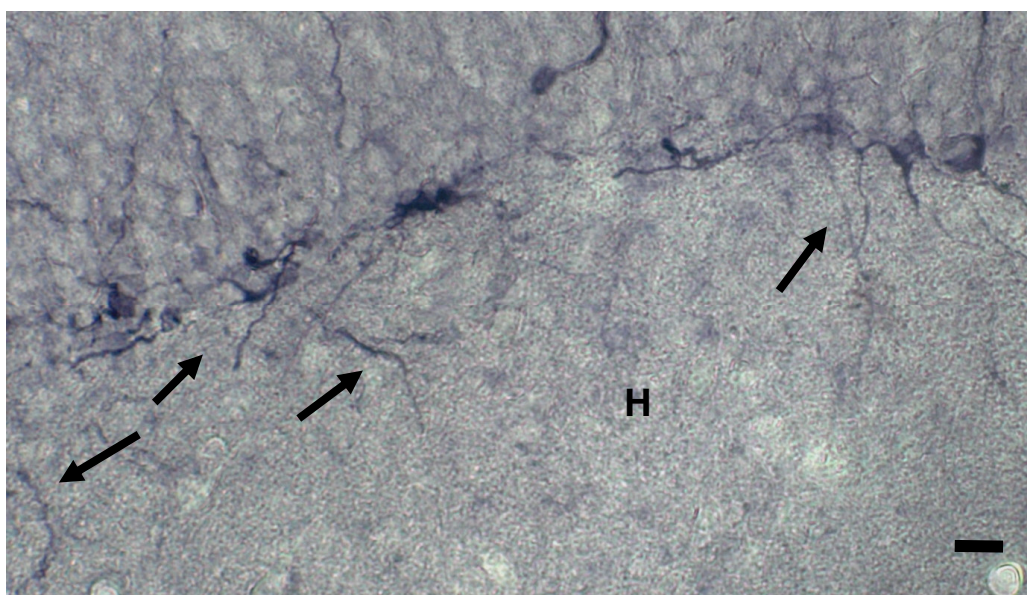


Abb. 14: Immunhistochemische Färbung des spezifischen Vorläuferzellproteins Doublecortin (DCX) mit Darstellung anfallsinduzierter, in den Hilus (H) reichender persistierender basaler Dendriten. Die Induktion eines SE führte, mit Ausnahme der Plannexin behandelten Tiere, 48h post SE-Induktion zu einer signifikanten Zunahme DCX-positiver Zellen mit basalen Dendriten im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrolltieren. Maßstabbalken = 20 μ m

Zur Beurteilung der Neurodegeneration, wurde im Folgenden ein immunhistochemischer Nachweis des neuronenspezifischen Proteins NeuN (*neuron specific nuclear protein*) vorgenommen (Kap. 4.1.7). Zunächst wurde in einem ersten Schritt das Ausmaß der Neurodegeneration in verschiedenen Bereichen des Ammonshorn (Cornu Ammonis, CA) an Hand einer von 0 (keine Neurodegeneration) bis 3 (sehr starke Neurodegeneration) reichenden Skala (Kap. 4.1.8) bewertet (Abb. 15).

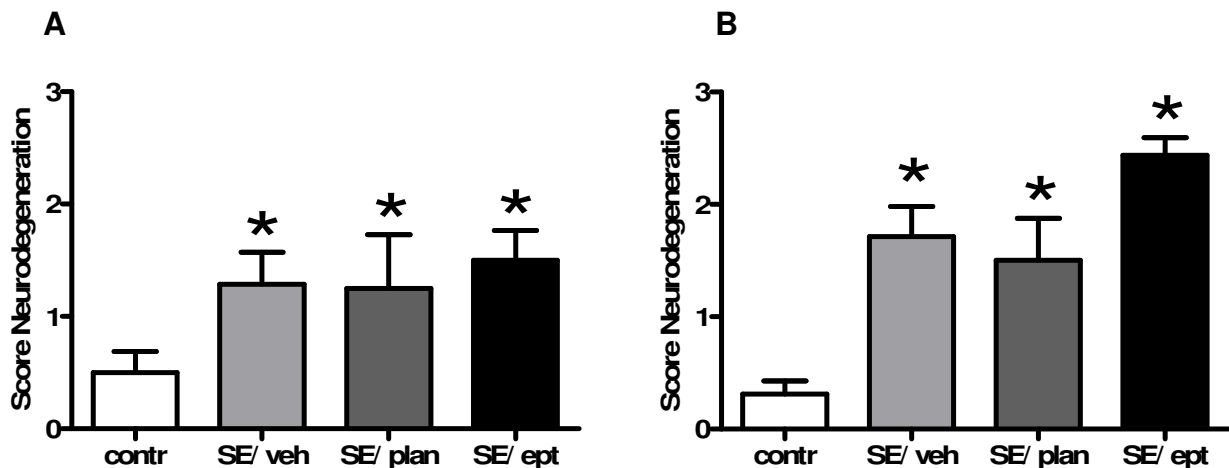


Abb. 15: Erfassung der Neurodegeneration mittels Score-System in der Gehirnregion des Ammonshorn (Cornu Ammonis, CA). Sowohl in der CA₁- (A) als auch in der CA₃-Region (B) war das Ausmaß der Neurodegeneration bei Tieren mit Pilocarpin-induziertem SE im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Zwischen den einzelnen SE-Tiergruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

Das Ausmaß einer Neurodegeneration in der CA₁- und CA₃-Region war bei Tieren mit Pilocarpin-induziertem SE signifikant höher als in Kontrolltieren. Ein Vergleich zwischen Epotris behandelten, Plannexin behandelten und Vehikel behandelten Tieren ergab hinsichtlich der Neurodegeneration in der CA₁- und CA₃-Region keine signifikanten Unterschiede (Abb. 15). Zur weiteren Charakterisierung der

Neurodegeneration wurden anschließend NeuN-positive Zellen im Hilus des Hippocampus ausgezählt (Kap. 4.1.8). Die Anzahl hilarer NeuN-positiver Zellen war bei allen Tiergruppen in denen ein SE induziert wurde, signifikant geringer als in Kontrolltieren. Ein Vergleich der SE-Tiergruppen ergab bezüglich der Anzahl NeuN-markierter Zellen im Hilus keine signifikanten Unterschiede (Abb. 16).

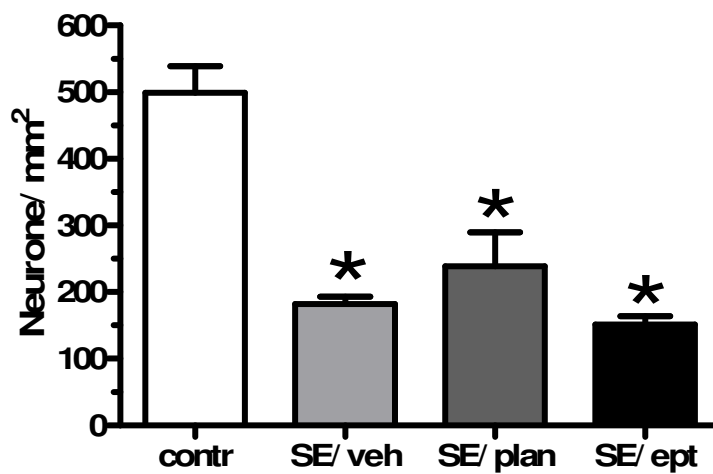


Abb. 16: Ausmaß der Neurodegeneration im Hilus des Hippocampus (Neuronenzählung).
Dargestellt sind die Anzahl NeuN-positiver Neurone pro mm² (Mittelwerte \pm SEM). Das Ausmaß der Neurodegeneration war in Tieren mit Pilocarpin-induziertem SE im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Anzahl NeuN-positiver hilarer Neurone pro mm² unterschied sich zwischen Vehikel behandelten Tieren und Plannexin bzw. Epotris behandelten Tieren nicht signifikant.

5.1.2 Elektrisches SE-Modell

Zur Beurteilung der Effekte der beiden EPO-mimetischen Peptide Epotris und Epobis im elektrischen SE-Modell wurde bei 43 weiblichen Sprague-Dawley Ratten eine Stimulations- bzw. Ableitungselektrode in die rechte BLA chronisch implantiert (Kap. 4.1.3). Im Anschluss an eine sechswöchige Rekonvaleszenzphase wurde bei 24 Tieren (acht Epotris behandelten, acht Epobis behandelten und acht Vehikel behandelten Tiere) mittels einer Dauerstimulation der rechten BLA ein sich selbst erhaltender SE (SSSE) induziert. Über einen Zeitraum von 48h vor der Stimulation bis 72h post stimulationem wurde den Tieren wiederholt das EPO-mimetische Peptid Epotris bzw. Epobis oder die Vehikellösung s.c. appliziert (Kap. 4.1.9). Vom vierten bis zum letzten Tag vor der Stimulation wurde den Tieren der Proliferationsmarker BrdU (50 mg/kg i.p., 2x tägl.) verabreicht. Die Dauerstimulation wurde entsprechend der Beschreibung in Kap. 4.1.3 durchgeführt und nach vier Stunden mit Diazepam (10 mg/kg) abgebrochen. Bei Bedarf wurde wiederholt Diazepam appliziert bis der SSSE beendet war. Alle acht stimulierten Epotris behandelten Tieren sowie alle acht stimulierten Epobis behandelten Tieren bildeten einen SSSE aus. Dabei manifestierte sich der SSSE bei einem Epotris behandelten Tier als fokaler SSSE mit generalisierten Anfällen (Typ II) und bei einem Epobis behandelten Tier als ausschließlich fokal (Typ I). Alle anderen Ratten bildeten einen generalisierten SE (Typ III) aus. Jeweils ein Epotris und ein Epobis behandeltes Tier mit generalisiertem SE mussten wenige Tage nach Statusinduktion euthanasiert werden. Von insgesamt acht stimulierten Vehikeltieren entwickelten sieben Tiere einen generalisierten SSSE (Typ III) und lediglich ein Tier einen fokalen SSSE mit generalisierten Anfällen (Typ II). Zwei Vehikeltiere mit generalisierter Anfallsaktivität verstarben wenige Stunden nach Beendigung des SSSE. Tab. 9 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse.

SE-BLA-Modell			
Anfallstyp des SSSE	Epotris (n = 8)	Epobis (n = 8)	Vehikel (n = 8)
fokaler SSSE (Typ I)	n=0	n=1	n=0
fokaler SSSE mit generalisierten Anfällen (Typ II)	n=1	n=0	n=1
generalisierter SSSE (Typ III)	n=7	n=7	n=7
Exitus während und nach generalisiertem SE	n=1	n=1	n=2

Tab. 9: Anzahl der Ratten mit den verschiedenen SSSE Typen

Über den gesamten Stimulationszeitraum wurde die Häufigkeit, der Zeitraum, der Zeitpunkt und die Dauer der generalisierten Anfälle erfasst. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den drei Stimulationsgruppen (Tab. 10). Am vierzehnten Tag nach der Dauerstimulation wurden die Tiere perfundiert (Kap. 4.1.6)

	SE/ Vehikel	SE/ Epotris	SE/ Epobis	Vehikel	Epotris	Epobis
Anzahl Tiere pro Gruppe	n=8	n=8	n=8	n=7	n=6	n=6
Anzahl verstorbener Tiere mit generalisiertem SE/ Mortalität in %	2/ 29	1/ 14	1/ 14	0/ 0	0/ 0	0/ 0
Latenzzeit bis zum ersten generalisierten Anfall (min)	3,75 ± 0,65	4,13 ± 0,51	3,83 ± 0,47	/	/	/
Latenzzeit bis zur Manifestation eines generalisierten SE (min)	31,00 ± 1,07	26,29 ± 2,78	31,83 ± 0,70	/	/	/

Tab. 10: Übersicht über die Tierzahlen und Beobachtungsparameter im SE-BLA-Modell.
 Angegeben sind die Anzahl von Tieren pro Behandlungsgruppe und die Anzahl der Tiere mit generalisierter Krampfaktivität. Weiterhin dargestellt ist die Anzahl verstorbener Tiere pro Tiergruppe und die Mortalität in %.

Immunhistochemie

Zum Nachweis von neuronalen Vorläuferzellen wurde eine Doublecortin-Färbung (Kap. 4.1.7) durchgeführt. Das mikrotubulinassoziierte Protein Doublecortin (DCX) wird transient von neuronalen Vorläuferzellen des Hippocampus und des olfaktorischen Systems exprimiert. Basierend auf dieser neuronalen vorläuferzellspezifischen Expression des Proteins eignet sich DCX sehr gut als quantitativer Marker zum Nachweis einer adulten Neurogenese (RAO u. SHETTY 2004). Im Folgenden wurden DCX-positive gefärbte Zellen mittels der "optical fractionator" Methode (Kap. 4.1.8) ausgezählt sowie morphologische Veränderungen der Dendriten dieser Zellen erfasst.

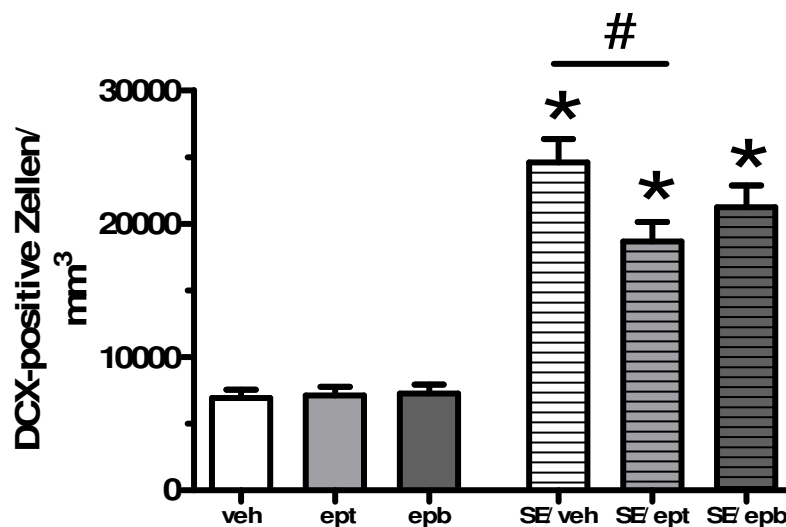


Abb. 17: Anzahl der DCX-positiven Zellen/ mm³ im Gyrus Dentatus des Hippocampus in den einzelnen Tiergruppen (Mittelwerte ± SEM). Die Gesamtzahl DCX-positiver Zellen war 14 Tage nach elektrischer SE-Induktion bei allen Statustiergruppen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe signifikant erhöht. Ein Vergleich der Statusgruppen untereinander ergab eine signifikant geringere Anzahl DCX-positiver Zellen bei Epotris behandelten Tieren im Vergleich zu Vehikel behandelten Tieren.

Die Anzahl DCX-positiver Zellen im Gyrus Dentatus des Hippocampus war 14 Tage post stimulationem bei allen Statustiergruppen signifikant höher als bei der entsprechenden Kontrolltiergruppe (Abb. 17). Eine Behandlung mit dem EPO-mimetischen Epotris-Tetramer reduzierte den anfallsinduzierten Anstieg der Anzahl

DCX-positiver Zellen. Epotris behandelte Statustiere wiesen signifikant weniger DCX-markierte Zellen auf, als Vehikel behandelte SE-Tiere (Abb. 17). Zur Beurteilung der Neurodegeneration wurde im Anschluss eine Nissl-Färbung durchgeführt (Kap. 4.1.7). Zusätzlich zur Quantifizierung der Neuronenanzahl erlaubte diese Methode eine Verifizierung der genauen Lage der implantierten Elektrode. Zur Charakterisierung einer Neurodegeneration wurde in einem ersten Schritt zunächst das Ausmaß der Neurodegeneration auf einer von 0 (keine Neurodegeneration) bis 3 (sehr starke Neurodegeneration) reichenden Skala (Kap. 4.1.8) beurteilt. Auf Grund einer geringeren Beeinträchtigung und Schädigung der Gehirnstrukturen im elektrischen BLA-Modell im Vergleich zum Pilocarpin-Modell konnte der Grad der Neurodegeneration in diesem Versuchsansatz zusätzlich zur Ammonshorn CA-Region ebenso in der Gehirnregion des piriformen Cortex (PC; Abb. 18) ausgewertet werden. Zudem war es möglich die einzelnen CA-Regionen differenziert voneinander auszuwerten (Abb. 19).

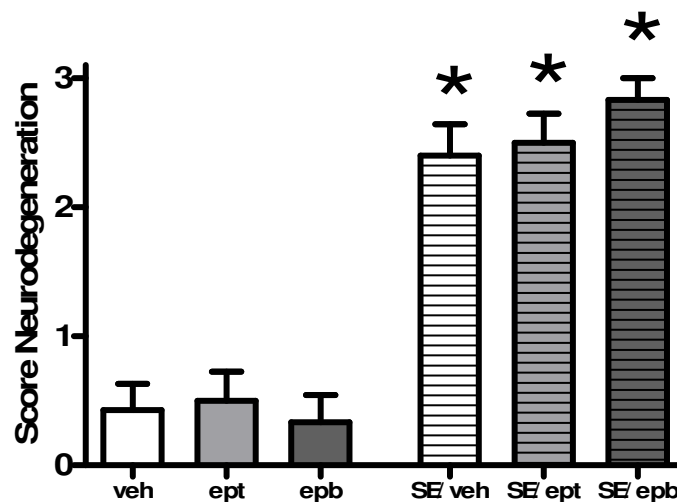


Abb. 18: Erfassung der Neurodegeneration mittels Score-System in der Gehirnregion des piriformen Cortex (PC). Das Ausmaß der Neurodegeneration im PC war bei Tieren mit elektrisch-induziertem generalisiertem SE im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erhöht.

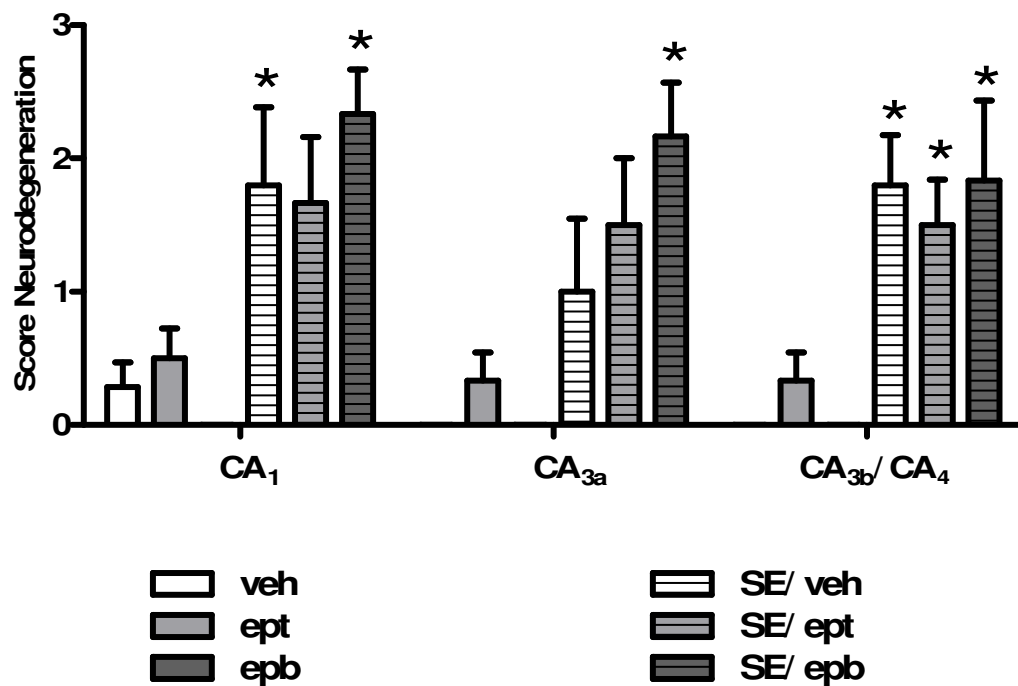


Abb. 19: Erfassung der Neurodegeneration mittels eines Score-System in verschiedenen Regionen des Ammonshorn. Bei allen Tieren mit elektrisch-induziertem SE konnte sowohl in der CA₁ als auch in der CA_{3a} und CA_{3b}/ CA₄-Region eine massive Neurodegeneration festgestellt werden. Tendenziell war bei der Epotris behandelten Statusgruppe eine geringere Neurodegeneration zu verzeichnen.

Zur weiteren Charakterisierung der Neurodegeneration wurden anschließend thioningefärbte Neuronen im Bereich des Hilus des Hippocampus mittels der "optical fractionator" Methode (Kap. 4.1.8) ausgezählt.

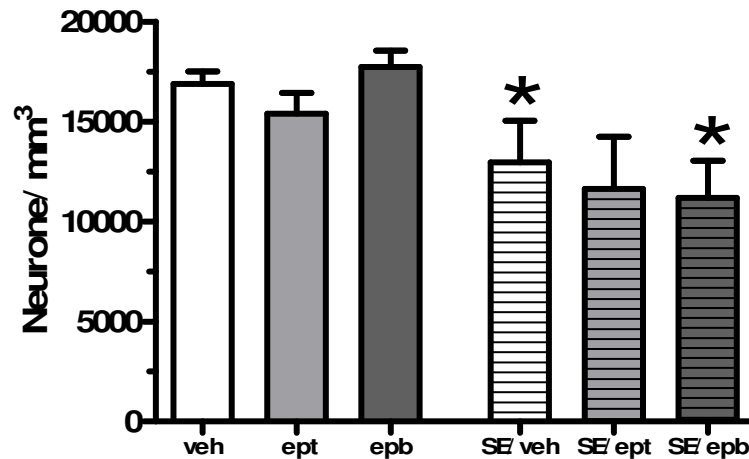


Abb. 20: Ausmaß der Neurodegeneration im Hilus des Hippocampus (Neuronenzählung). Dargestellt ist die Anzahl thioninegefärbter Neurone pro mm³ (Mittelwerte \pm SEM). Das Ausmaß der Neurodegeneration war bei Vehikel behandelten und Epobis behandelten SE-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Epotris behandelte SE-Tiere unterschieden sich bezüglich der Anzahl an Neuronen/ mm³ nicht signifikant von der entsprechenden Kontrollgruppe. Ein Vergleich der SE-Tiergruppen untereinander ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Die Anzahl thioninegefärbter Neurone im Hilus des Hippocampus war bei SE/ Vehikel behandelten und SE/ Epobis behandelten Tieren signifikant geringer als bei den entsprechenden Kontrolltieren. Epotris behandelte SE-Tiere unterschieden sich bezüglich der Anzahl an Neuronen/ mm³ nicht signifikant von der entsprechenden Kontrollgruppe. Allerdings ergab ein Vergleich der SE-Tiergruppen untereinander bezüglich der Anzahl thioninegefärbter Neurone im Hilus keine signifikanten Unterschiede (Abb. 20). Epotris behandelte Statustiere unterschieden sich in der Anzahl hilarer Neurone nicht von Vehikel behandelten SE-Tieren.

5.2 MODIFIKATION DER PGP-EXPRESSION MITTELS RNA-INTERFERENZ

Die Untersuchungen zur Beeinflussung der Pgp-Expression durch RNA-Interferenz wurden im Mausmodell mit zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurde anti-Pgp siRNA zweimalig über einen Zeitraum von 48h verabreicht. In einem zweiten Ansatz erfolgte die siRNA-Applikation viermal über einen Zeitraum von vier Tagen.

5.2.1 Zweitägige siRNA-Behandlung

Die Effekte einer zweitägigen Behandlung mit anti-Pgp siRNA wurden an 54 männlichen Balb/c Mäusen untersucht. Dabei wurden zwei unterschiedliche Applikationsansätze verfolgt (Tab. 5, Kap. 4.2.3). Einer ersten Gruppe von Tieren wurde unverpackte siRNA site 5m oder site 10m bzw. Vehikellösung im hydrodynamischen Verfahren in die Schwanzvene appliziert. Eine zweite Gruppe erhielt eine i.v. Injektion in Liposomen verpackter siRNA site 5m oder site 10m bzw. Leerliposomen (Kap. 4.2.3). Während den Applikationen kam es bei einigen Tieren, unabhängig der Behandlungsgruppe, zu Krampfanfällen mit schwerfälliger Atmung und anschließender Hypoaktivität. Infolge der starken Kreislaufbelastung durch die hydrodynamische Injektion verstarb während der ersten Applikation ein mit Leerliposomen behandeltes Kontrolltier und im Anschluss an die zweite Applikation ein mit unverpackter siRNA site 10m behandeltes Tier. 24h nach der zweiten Applikation wurden die Tiere für nachfolgende Untersuchungen zur Expressionsregulation von P-Glycoprotein dekapitiert.

Immunhistochemie

Die Expression von Pgp wurde für den Zeitpunkt 24h nach der letzten siRNA-Applikation durch computergestützte Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Pgp quantifiziert (Kap. 4.2.6). Als Maß für die Höhe der Pgp-Expression wurden die Pgp-markierte Fläche in % der Gesamtfläche sowie die optische Dichte (OD) herangezogen.

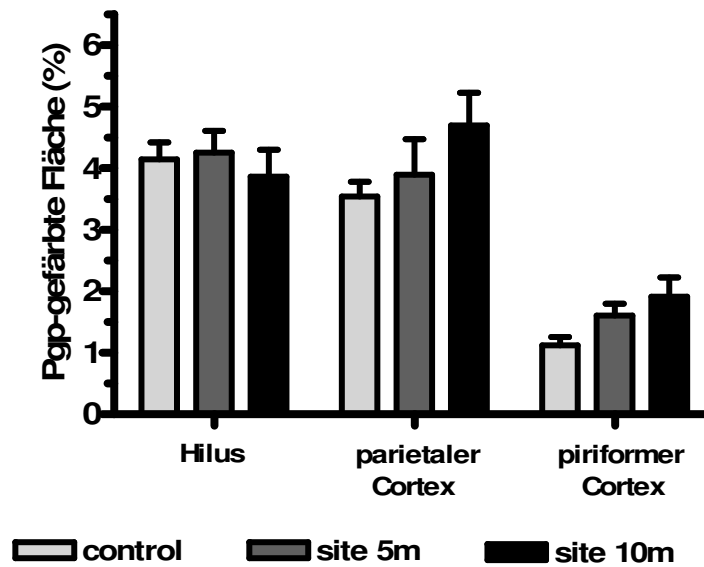


Abb. 21: Pgp-markierte Fläche [(in %) der Gesamtfläche] 24h nach der letzten Applikation unverpackter siRNA. Die Pgp-markierte Fläche wurde in coronalen Gehirnschnitten im Bereich des Hilus, des parietalen Cortex und des piriformen Cortex gemessen. Pro Region wurden zwei Ebenen (-1,3 mm und -1,7 mm relativ zu Bregma) gemessen und deren Ergebnisse gemittelt. Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM.

Für den zweitägigen Applikationsansatz unverpackter siRNA ergaben sich für alle untersuchten Gehirnregionen sowohl bei der Auswertung der Pgp-gefärbten Fläche in % der Gesamtfläche (Abb. 21) als auch bei der OD (Abb. 22) keine signifikanten Unterschiede in der Pgp-Expression zwischen siRNA behandelten (site 5m bzw. site 10m) und Vehikel behandelten Tieren.

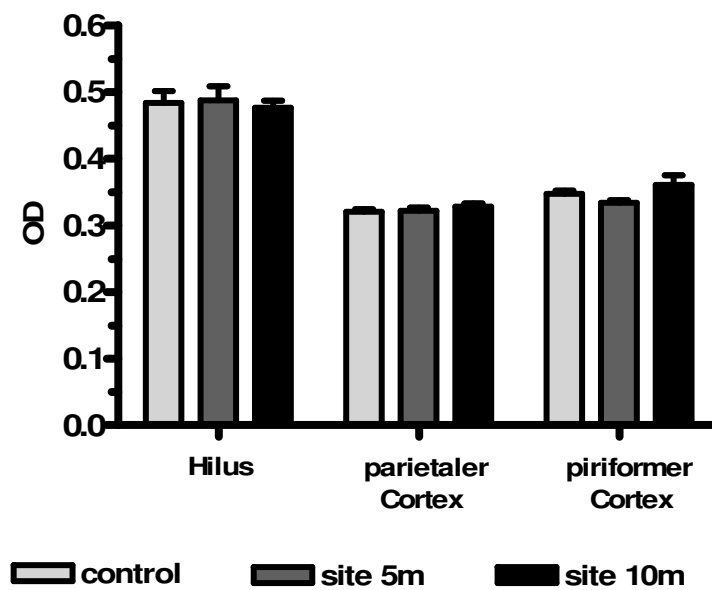


Abb. 22: Optische Dichte 24h nach der zweiten Applikation unverpackter siRNA. Für jedes Tier wurde die OD im Bereich des Hilus, des parietalen Cortex und des piriformen Cortex bestimmt. Pro Region wurden zwei Ebenen (-1,3 mm und -1,7 mm relativ zu Bregma) gemessen und deren Ergebnisse gemittelt. Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM.

In einem weiteren Applikationsansatz wurde sowohl siRNA site 5m, als auch siRNA site 10m zur Stabilitätsverbesserung in Liposomen verbracht und i.v. appliziert. Der korrespondierenden Kontrollgruppe wurde das identische Volumen an Leerliposomen verabreicht.

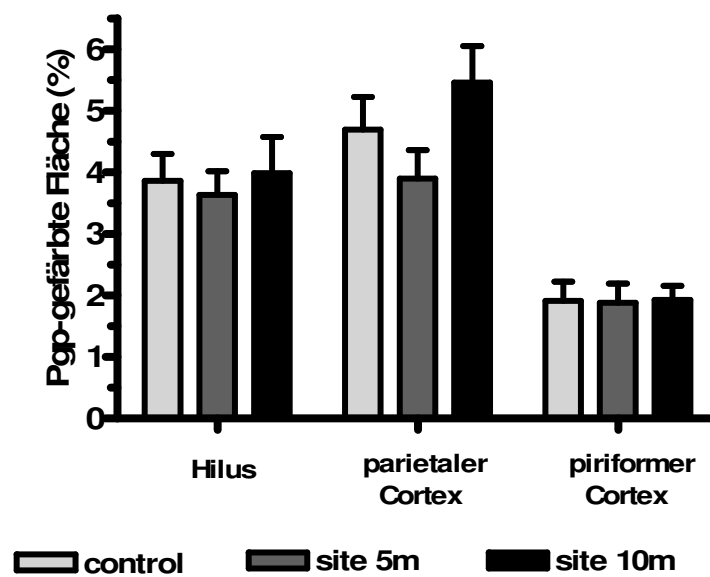


Abb. 23: Pgp-markierte Fläche [(in %) der Gesamtfläche] 24h nach der letzten Applikation in Liposomen verpackter siRNA. Die Pgp-markierte Fläche wurde in coronalen Gehirnschnitten im Bereich des Hilus, des parietalen Cortex und des piriformen Cortex gemessen. Pro Region wurden zwei Ebenen (-1,3 mm und -1,7 mm relativ zu Bregma) gemessen und deren Ergebnisse gemittelt. Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM.

Entsprechend der zweimaligen Applikation unverpackter siRNA führte sowohl die zweimalige Applikation in Liposomen-verpackter siRNA site 5m als auch site 10m zu keinen signifikanten Unterschieden in der Pgp-gefärbten Fläche (Abb. 23) und in der OD (Abb. 24). In allen untersuchten Gehirnregionen glichen die entsprechenden Werte denen der korrespondierenden Leerliposomen-Kontrollgruppe.

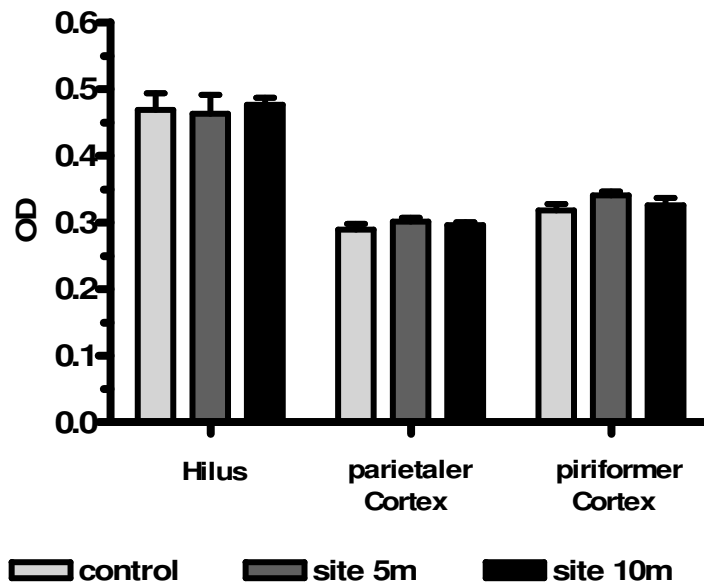


Abb. 24: Optische Dichte 24h nach der zweiten Applikation in Liposomen verpackter siRNA. Für jedes Tier wurde die OD im Bereich des parietalen Cortex und des piriformen Cortex bestimmt. Pro Region wurden zwei Ebenen (-1,3 mm und -1,7 mm relativ zu Bregma) gemessen und zu einem Mittelwert addiert. Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM.

5.2.2 Viertägige siRNA-Behandlung

Die Auswirkungen einer über vier Tage andauernden Applikation anti-Pgp siRNA wurde ebenfalls an männlichen Balb/c Mäusen untersucht. Bei diesem Versuchsansatz wurde 13 Mäusen unverpackte siRNA site 5m i.v. nach der hydrodynamischen Methode (Kap. 4.2.3) appliziert. 13 Kontrolltiere wurden mit dem identischen Volumen an NaCl behandelt. Ebenso wie beim zweitägigen Versuchsansatz kam es auch bei den siRNA-Behandlungen über vier Tage während den Applikationen zu Krampfanfällen mit schwerfälliger Atmung und anschließender Hypoaktivität. Dabei zeigten sich keine Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens zwischen Kontrolltieren und siRNA behandelten Tieren. Nach der ersten Applikation musste ein Kontrolltier auf Grund starker entzündlicher Veränderungen im Bereich der Applikationsstelle am Schwanz getötet werden. Ein weiteres Kontrolltier verstarb während der vierten Applikation. Ebenfalls verstarben zwei siRNA behandelte Tiere nach der zweiten bzw. dritten Applikation.

Histologie

Die Quantifizierung der Pgp-Expression erfolgte in Analogie zum zweitägigen Versuchsansatz ebenfalls nach erfolgter immunhistochemischer Pgp-Färbung der Gehirnschnitte durch eine computergestützte Auswertung (Kap. 4.2.6). Bewertet wurde ebenfalls die Pgp-gefärbte Fläche sowie die optische Dichte der gefärbten Bereiche für die drei Gehirnregionen, Hilus, parietaler Cortex und piriformer Cortex.

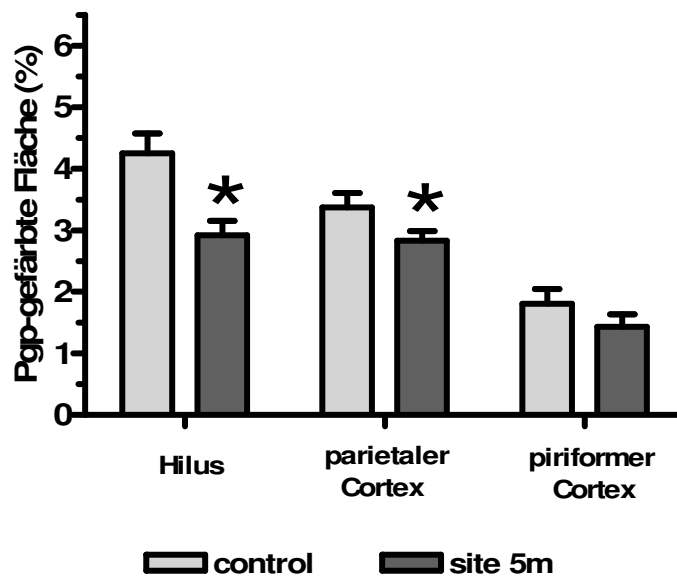


Abb. 25: Pgp-markierte Fläche [(in %) der Gesamtfläche] 24h nach der vierten Applikation unverpackter siRNA site 5m. Die Pgp-markierte Fläche wurde in coronalen Gehirnschnitten im Bereich des Hilus, des parietalen Cortex und des piriformen Cortex gemessen. Pro Region wurden zwei Ebenen (-1,3 mm und -1,7 mm relativ zu Bregma) gemessen und zu einem Mittelwert addiert. Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM.

Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit unverpackter siRNA (site 5m) über vier aufeinanderfolgende Tage zu einer immunhistochemisch detektierbaren signifikanten Reduktion des prozentualen Anteils der Pgp-gefärbten Fläche im Hilus und im parietalen Cortex, nicht jedoch im piriformen Cortex führt (Abb. 25 und 26). Die OD blieb unbeeinflusst und unterschied sich zwischen siRNA und Vehikel behandelten Mäusen nicht (Abb. 27).

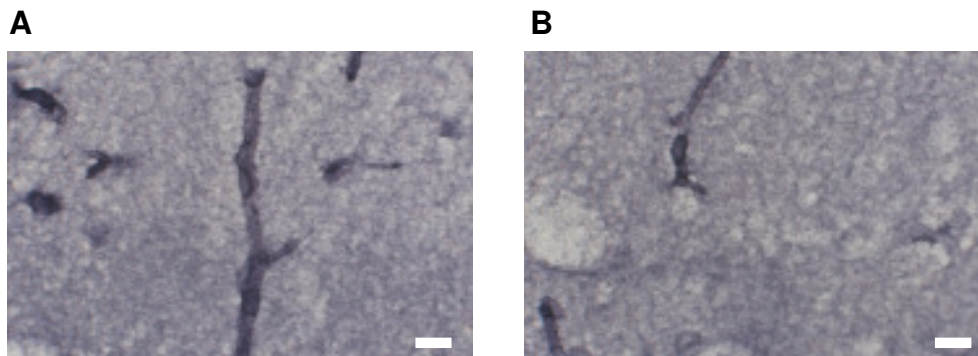


Abb. 26: Immunhistochemische Färbung des Multidrug-Transporters Pgp im Hilus des Hippocampus eines Vehikel behandelten Kontrolltieres (A) und eines mit unverpackter siRNA (site 5m) behandelten Tieres (B). Eine Behandlung mit unverpackter siRNA (site 5m) über vier aufeinanderfolgende Tage führte zu einer immunhistochemisch detektierbaren signifikanten Reduktion des prozentualen Anteils der Pgp-gefärbten Fläche im Hilus (s. Abb.) und im parietalen Cortex. Maßstabsbalken = 10 μ m

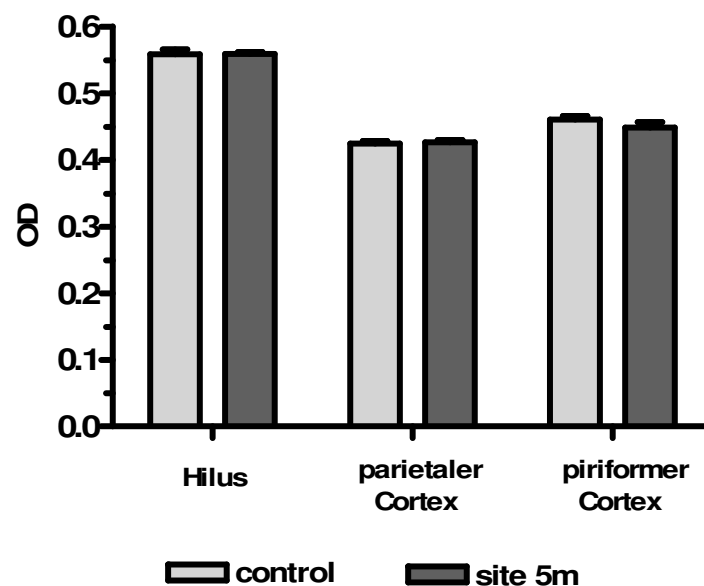


Abb. 27: Optische Dichte 24h nach der vierten Applikation unverpackter siRNA site 5m. Für jedes Tier wurde die OD im Bereich des Hilus, des parietalen Cortex und des piriformen Cortex bestimmt. Pro Region wurden zwei Ebenen (-1,3 mm und -1,7 mm relativ zu Bregma) gemessen und zu einem Mittelwert addiert. Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM.

Real-Time PCR

Zusätzlich zu der immunhistochemischen Untersuchung der Gehirnpräparate wurde, sowohl für Gehirn- als auch für Lebergewebe, eine Quantifizierung der Pgp-Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR vorgenommen. Diese Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Uhr am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München durchgeführt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen konnten mittels RealTime-PCR sowohl im Gehirn (Abb. 28), als auch in der Leber (Abb. 29) keine signifikanten Unterschiede in der Pgp-Expression verzeichnet werden.

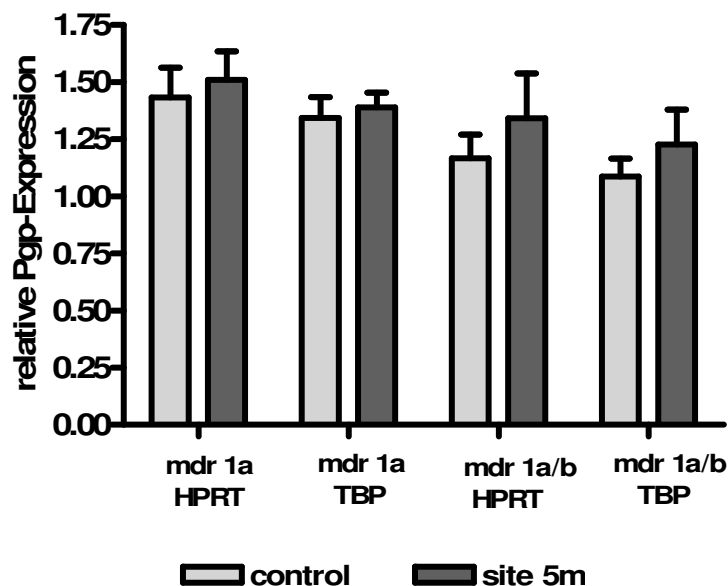


Abb. 28: Relative mRNA-Expression der Pgp-kodierenden Gene *mdr1a* bzw. *mdr1a/1b* im Gehirn siRNA (site 5m) und Vehikel behandelte Mäuse. Die ermittelten Werte sind relative Werte bezogen auf unterschiedliche housekeeping-Gene (HPRT und TBP). Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM.

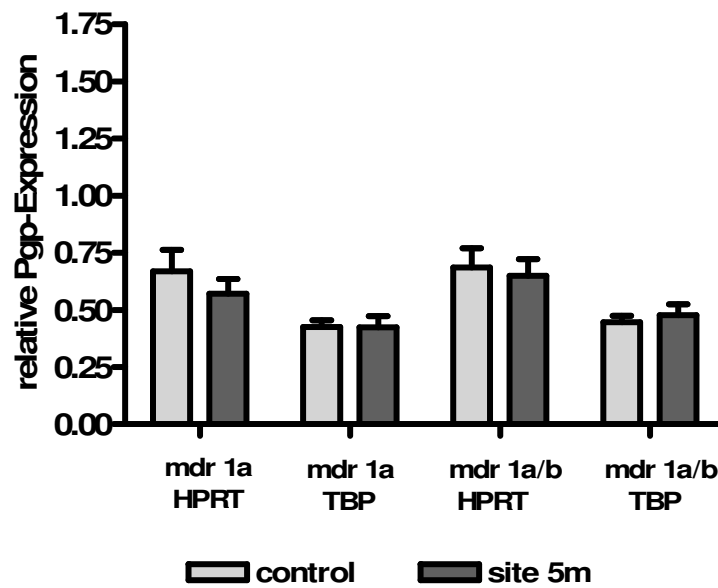


Abb. 29: Relative mRNA-Expression der Pgp-kodierenden Gene *mdr1a* bzw. *mdr1a/1b* in der Leber siRNA (site 5m) und Vehikel behandelte Mäuse. Die ermittelten Werte sind relative Werte bezogen auf unterschiedliche housekeeping-Gene (HPRT und TBP). Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM.

6 DISKUSSION

6.1 MODULATION ANFALLSINDUZierter NEURONALER VERÄNDERUNGEN DURCH MIMETISCHE PEPTIDE

Die genauen Mechanismen der Entstehung symptomatischer Epilepsien sind bislang weitgehend ungeklärt. Folglich fehlt bis heute ein konkreter Ansatz zur Entwicklung einer Prophylaxe von Epilepsien. Diverse Publikationen der letzten Jahre beschreiben im Zusammenhang mit dem Prozess der Epileptogenese mannigfaltige Veränderungen der neuronalen Plastizität, insbesondere eine gestörte Neuronenneubildung (PARENT et al. 1998b; SCOTT et al. 1998), sowie einen massiven Neuronenverlust (SLOVITER et al. 1996; VELISEK u. MOSHE 2003). Diesen anfallsinduzierten neuropathologischen Veränderungen spricht man nach derzeitigen Wissensstand eine wesentliche Beteiligung an der Entstehung eines epileptogenen, prokonvulsiven Netzwerkes zu, das schließlich in der Manifestation einer Epilepsie resultiert. Folglich könnte die Prävention dieser anfallsinduzierten neuronalen Plastizitätsveränderungen sich günstig auf den Gesamtprozess der Epileptogenese auswirken. Bisherige Forschungsarbeiten weisen auf eine regulatorische Funktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) und des Hormons Erythropoetin (EPO) an der neuronalen Plastizität hin (DAME et al. 2001; SHINGO et al. 2001; SEIDENFADEN et al. 2006; RANSOME u. TURNLEY 2007). In den vergangenen Jahren wurden mimetische Peptide dieser Proteine entwickelt, die eine Neuroplastizität beeinflussende Eigenschaft besitzen. Die Anwendung von EPO- und NCAM-mimetischen Peptiden könnte demnach eine erfolgversprechende neue Strategie zur Modulation anfallsinduzierter, neuronaler Veränderungen im epileptischen Gehirn darstellen.

6.1.1 Modulation anfallsinduzierter neuronaler Veränderungen durch mimetische Peptide: Auswirkungen im chemischen SE-Modell

Infolge der systemischen Applikation des parasymphomimetisch wirksamen Alkaloids Pilocarpin entwickelt eine Vielzahl der Tiere einen SE (HONCHAR et al. 1983; CAVALHEIRO et al. 1991). Durch eine 12-24h vorausgehende Applikation von Lithium kann die Pilocarpinwirkung potenziert werden (HONCHAR et al. 1983; JOPE

et al. 1986). Die Anfallsaktivität bewirkt diverse neurohistopathologische Veränderungen. Hierzu zählen massive Neuronenverluste (DUBE et al. 2001; VOUTSINOS-PORCHE et al. 2004), eine Induktion der physiologisch basalen Proliferation neuronaler Vorläuferzellen (CHA et al. 2004; PARENT et al. 2006; SHAPIRO et al. 2007) sowie die Persistenz basaler, in den Hilus ziehender Dendriten (SHAPIRO et al. 2005; SHAPIRO u. RIBAK 2006). Derzeit geht man davon aus, dass diese pathomorphologischen Umgestaltungen auf neuronaler Ebene die Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität unterstützen.

Plannexin und Epotris haben im Pilocarpin-Modell keinen Einfluss auf die Induktion, den Verlauf und den Schweregrad des SE

In bisher durchgeführten Studien zu Effekten mimetischer Peptide wurden schwerpunktmäßig insbesondere Effekte auf neuronaler Ebene untersucht und diskutiert. Dabei konnte sowohl für NCAM- als auch für EPO-mimetische Peptide eine Wirksamkeit auf neuronaler Ebene bestätigt werden (BEREZIN u. BOCK 2004; SKIBO et al. 2005; HOKE 2006; KLEMENTIEV et al. 2007; SONN et al. 2007). Es ist bekannt, dass die Initiierung der Pilocarpin-induzierten Anfallsaktivität und deren weiterer Verlauf über Modulationen der synaptischen Transmission und damit assoziierten plastischen Netzwerkveränderungen beeinflussbar sind (BRENNEKE et al. 2004; VIANNA et al. 2005). Daher sollte in dieser Arbeit in Addition zu den Auswirkungen des NCAM-Abkömmlings Plannexin und des EPO-mimetischen Peptids Epotris auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen der Einfluss dieser mimetischen Peptide auf die Induktion, den Verlauf und den Schweregrad des SE bewertet werden. Es zeigte sich jedoch, dass weder Plannexin noch Epotris Auswirkungen auf die Induktion, den Verlauf und den Schweregrad des SE hatten (Tab. 8, Kap. 5.1.1). Dieser Befund deutet daraufhin, dass weder Plannexin- noch Epotris-induzierte Effekte auf neuronaler Ebene eine Änderung in der Anfallsempfindlichkeit oder der Anfallsausbreitung bewirken konnten. Um abzuklären, welche Auswirkungen per se diese beiden Peptide auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen in dem von uns angewendeten Pilocarpin-Modell hatten, wurden immunhistochemische Untersuchungen angeschlossen.

Plannexin schützt neuronale Vorläuferzellen und reduziert die Persistenz basaler Dendriten

Analog zu bestehenden Daten (SHAPIRO et al. 2005; PARENT et al. 2006; SHAPIRO u. RIBAK 2006) konnte gezeigt werden, dass es bei Statustieren zu einer signifikanten Reduktion neuronaler Vorläuferzellen (Abb. 12, A und 13) und zu einer Persistenz von Körnerzellen mit hilaren basalen Dendriten (Abb. 12, B und 14) 48h nach SE-Induktion kommt. Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit dem NCAM-mimetischen Peptid Plannexin eine partielle Protektion neuronaler Vorläuferzellen bewirkte (Abb. 12, A). Des Weiteren reduzierte Plannexin signifikant die Manifestation persistierender basaler Dendriten (Abb. 12, B). Basierend auf bis dato unveröffentlichten Daten aus Studien unserer Arbeitsgruppe haben wir Hinweise, dass diese, unmittelbar mit dem SE verbundene, Degeneration neuronaler Zellen zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Induktion der Vorläuferzellproliferation führt. Wir postulieren, dass sowohl die Degeneration als auch die induzierte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen, sowie die Ausbildung persistierender neuronaler Dendriten an der Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität durch die Generierung eines prokonvulsiven Netzwerkes beteiligt sind. In jüngster Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass das NCAM-Molekül neben heterophilen (NCAM-diverse Zelladhäsionsmoleküle) auch homophile (NCAM-NCAM) Bindungseigenschaften hat (POVLSEN et al. 2003; HINSBY et al. 2004; WALMOD et al. 2004). Ferner wurde beobachtet, dass eine NCAM-vermittelte homophile Zelladhäsion zu einer Aktivierung verschiedenster Rezeptoren mit nachgeschalteten komplexen Signalkaskaden führt (DOHERTY et al. 1996; DOHERTY u. WALSH 1996; HALL et al. 1996; POVLSEN et al. 2003; HINSBY et al. 2004). Hierzu zählen z.B. die Aktivierung des Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-Rezeptor-PhospholipaseC γ (PLC γ) Signalweges, des *mitogen-activated protein Kinase* (MAPK)-Signalweges sowie die Aktivierung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Basierend auf aktuellen Studienergebnissen, geht man derzeit davon aus, dass insbesondere eine Stickoxid (NO)-vermittelte Aktivierung von cGMP entscheidend an der neuroprotektiven Funktion von NCAM beteiligt ist (DITLEVSEN et al. 2007). So könnte in den Versuchen dieser Arbeit Plannexin, dessen Peptidstruktur die beiden NCAM-homophilen Bindungsstellen einschließt, über entsprechende Signalwege zu einer Protektion neuronaler Vorläuferzellen geführt haben. Welchen Einfluss eine Plannexin-Behandlung auf den Gesamtprozess der

Epileptogenese und insbesondere auf die Manifestation bzw. den Schweregrad einer Epilepsie hat, bleibt unklar und muss in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden. Zu diesem Zweck müssen Untersuchungen in chronischen SE-Modellen durchgeführt werden, die eine Aussage über Effekte auf die Epileptogenese sowie auf die Manifestation einer Epilepsie zulassen. Eine Behandlung mit dem EPO-mimetischen Peptid Epotris beeinflusste weder die anfallsinduzierte Degeneration neuronaler Vorläuferzellen noch die Persistenz hilarer basaler Dendriten. EPO-Rezeptoren sind nachweislich auf neuronalen Vorläuferzellen präsent (SHINGO et al. 2001; CHEN et al. 2006). Vermittelt über diese Rezeptoren berichten zahlreiche Studien über EPO-assoziierte Effekte auf die Neuronenneubildung und die neuronale Plastizität (SHINGO et al. 2001; MARTI 2004; BARTESAGHI et al. 2005; CHEN et al. 2006). Für die fehlenden Wirkungen einer Behandlung mit dem EPO-mimetischen Peptid Epotris in dieser Arbeit müssen verschiedene Ursachen in Betracht gezogen werden. Ein erheblicher Einflussfaktor auf die Ergebnisse dieser Studie ist sowohl die gewählte Dosierung als auch die Applikationsanzahl der Substanzen. Die Dosierungsmenge von 10 mg/kg wurde uns von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Bock (University of Copenhagen/Denmark) in Anlehnung an bisherige *in vivo* Studien empfohlen. Das Behandlungsprotokoll von neun Behandlungen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen basiert auf bereits erfolgreich durchgeführten ähnlichen Versuchsansätzen. So ist es sehr unwahrscheinlich, dass die mangelnde Effektivität des eingesetzten Epotris auf einer Unterdosierung beruhte. Eine weitere zu berücksichtigende Schwierigkeit beim Einsatz mimetischer Peptide mit gewünschtem Wirkungseintritt im Gehirnparenchym ist die Passage der Blut-Hirn-Schranke. Diverse Studienergebnisse (KLEMENTIEV et al. 2007; KLEMENTIEV et al. 2008) beschreiben allerdings in Zusammenhang mit Untersuchungen bezüglich der Wirksamkeit von mimetischen Peptiden im Gehirn die s.c. Applikation als sehr gute und überaus effektive Methode. Die Effekte des EPO-mimetischen Peptid Epotris auf anfallsinduzierte Veränderungen wurden von uns erstmals im Pilocarpin-Modell untersucht. Zu Versuchsbeginn konnte uns damals ausschließlich das bis dato entwickelte Epotris-Dimer zur Verfügung gestellt werden. In der Zwischenzeit wurde zusätzlich ein Epotris-Tetramer entwickelt, dessen Wirksamkeit basierend auf neuen Erkenntnissen und Techniken potenziert werden konnte. So ist es unter Umständen möglich, dass die *in vivo*-Wirksamkeit des Epotris-Dimer nicht ausreichte, um die mit dem Pilocarpin-Modell assoziierten massiven neuronalen Veränderungen zu

beeinflussen. Auf Grund dieser Überlegungen wurden von uns in einem nachfolgenden Versuchsansatz zwei wichtige Änderungen im Versuchsdesign vorgenommen. Für weitere Untersuchungen zu Effekten mimetischer Peptide auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen wurde nun nicht mehr das Pilocarpin-Modell, sondern das in unserer Arbeitsgruppe erst kürzlich aufgebaute und etablierte elektrische SE-BLA Modell verwendet. Dieses Modell spiegelt die Symptomatik und Pathophysiologie der Epilepsieerkrankung beim Humanpatienten besser wieder. Das Ausmaß der in diesem Modell auftretenden neuronalen Schädigungen bleibt auf Regionen, die an der Anfallsinitiierung und Propagation beteiligt sind, beschränkt. Eine Expansion in andere Gehirnregionen wie im Pilocarpin-Modell findet nicht statt. Desweiteren wurde bei den Studien im elektrischen Modell ausschließlich das neu entwickelte Epotris-Tetramer eingesetzt. Die Behandlungsanzahl wurde basierend auf ersten Kinetikstudien und *in vivo* Untersuchungen dem Epotris-Tetramer angepasst und auf fünf Behandlungen beschränkt.

Plannexin und Epotris haben im Pilocarpin-Modell keinen neuroprotektiven Effekt auf postmitotische Neurone

Entsprechend den Ergebnissen vergleichbarer Studien (ANDRE et al. 2007) konnte 48h nach Statusinduktion eine deutliche Degeneration von Pyramidenzellen der CA₁- (Abb. 15, A) und CA₃-Region (Abb. 15, B) sowie von hilaren Neuronen (Abb. 16) bei Statustieren im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden. Weder eine Plannexin- noch eine Epotris-Behandlung verhinderte diese anfallsinduzierte Degeneration ausdifferenzierter postmitotischer Neurone. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu bisherigen Studien, in denen sowohl für NCAM- (BEREZIN u. BOCK 2004; KLEMENTIEV et al. 2007) als auch für EPO-mimetische Peptide (SONN et al. 2007) neuroprotektive Eigenschaften in Tiermodellen neurologischer Erkrankungen nachgewiesen wurden. Mögliche Ursachen für eine fehlende Effektivität des EPO-mimetischen Peptid Epotris sind bereits unter der Überschrift „*Plannexin schützt neuronale Vorläuferzellen und reduziert die Persistenz basaler Dendriten*“ in Kapitel 6.1.1 ausführlich beschrieben. So beruht die fehlende Neuroprotektion durch eine Epotris-Behandlung wahrscheinlich ebenfalls auf einer ungenügenden *in vivo*-Wirksamkeit des Epotris-Dimer. Da der NCAM-Abkömmling Plannexin in diesem Versuchsansatz nachweislich deutliche Effekte auf die Degeneration neuronaler Vorläuferzellen und auf die Ausbildung basaler Dendriten

hatte, ist davon auszugehen, dass ausreichend wirksames und aktives Plannexin das Gehirnparenchym erreicht hat. So könnte das fehlende neuroprotektive Potential des NCAM-Abkömmling Plannexin modellabhängig sein oder auf einer lediglich geringgradig ausgebildeten neuroprotektiven Funktion des Proteins selbst begründet sein. Im angewendeten fraktionierten Pilocarpin-Modell bewirkt die systemische Applikation des parasymphomimetisch wirksamen Pilocarpin einen massiven Neuronenuntergang (TURSKI et al. 1983; CLIFFORD et al. 1987). Eine Neurodegeneration manifestiert sich in diesem SE-Modell nicht nur in Regionen, die an der Anfallsinitiierung und Propagation beteiligt sind. Stattdessen kommt es in nahezu allen Gehirnarealen beider Hemisphären zu einem erheblichen Neuronenverlust (DUBE et al. 2001; VOUTSINOS-PORCHE et al. 2004). Es ist daher davon auszugehen, dass lediglich Substanzen mit einem stark ausgeprägten neuroprotektiven Potential einen detektierbaren neuronalen Schutz bewirken können. Mit dem Ziel eine modellabhängige Ursache auszuschließen zu können, wurde für folgende Untersuchungen zur Wirksamkeit mimetischer Peptide das SE-BLA Modell verwendet. Wie bereits beschrieben, spiegelt dieses SE-Modell sowohl die Symptomatik als auch die Pathogenese der Epilepsieerkrankung sehr gut wieder. Neurodegenerative Prozesse treten vorrangig in bestimmten, an der Anfallsinitiierung beteiligten Gehirnregionen (Hilus des Hippocampus, Ammonshorn, piriformer Cortex) auf und dehnen sich nicht unkontrolliert in andere Bereiche aus (BRANDT et al. 2001; BRANDT et al. 2003).

6.1.2 Modulation anfallsinduzierter neuronaler Veränderungen durch mimetische Peptide: Auswirkungen im elektrischen SE-Modell

Infolge einer Dauerstimulation der basolateralen Amygdala (BLA) entwickelt die Mehrzahl der Tiere einen sich selbst erhaltenden Status epilepticus (SSSE). Während der anhaltenden Anfallsaktivität werden eine Vielzahl akuter neuroplastischer Veränderungen, insbesondere die Degeneration hilarer Neurone, induziert (BRANDT et al. 2001; BRANDT et al. 2003).

Die Epo-mimetischen Peptide Epotris und Epobis haben im elektrischen SE-BLA-Modell keinen Einfluss auf die Induktion, den Verlauf und den Schweregrad des SE

Gleich den Untersuchungen im chemischen SE-Modell wurde im elektrischen SE-Modell neben den Auswirkungen der EPO-mimetischen Peptids Epotris und Epobis auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen ebenfalls deren Einfluss auf die Induktion, den Verlauf und den Schweregrad des SE bewertet. Analog den Ergebnissen aus dem Pilocarpin-Modell beeinflusste weder eine Epotris- noch eine Epobis-Behandlung die Induktion, den Verlauf oder den Schweregrad des SE (Tab. 10, Kap. 5.1.2). So ist anzunehmen, dass die Effekte der beiden EPO-mimetischen Peptide auf neuronaler Ebene sich nicht auf die Anfallsempfindlichkeit oder die Anfallsausbreitung auswirkten. In der Folge durchgeführte immunhistochemische Untersuchungen sollten darlegen, welche Effekte eine Epotris bzw. Epobis-Behandlung auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen haben.

Das EPO-Tetramer Epotris reduziert die anfallsinduzierte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen

Die Induktion eines SE mittels 25-minütiger Stimulation der BLA führte analog zu Daten aus anderen SE-Modellen (PARENT et al. 1997; GRAY u. SUNDSTROM 1998; PARENT et al. 1998; PARENT et al. 2006) 14 Tage post stimulationem zu einem massiven Anstieg der Anzahl neuronaler Vorläuferzellen (Abb. 17). Eine Behandlung mit dem EPO-mimetischen Peptid Epotris reduzierte partiell diese anfallsinduzierte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen verglichen mit Vehikel behandelten SE-Tieren (Abb. 17). Derzeit wird spekuliert, dass die drastische Induktion der Neurogenese eine Folge der zu einem frühen Zeitpunkt stattfindenden Schädigung und Degeneration neuronaler Vorläuferzellen (Abb. 12) ist. Ferner nimmt man an, dass neugebildete Neurone zur Generierung eines prokonvulsiven Netzwerkes beitragen und wesentlich an der Entstehung und Ausbreitung epileptischer Aktivität beteiligt sind. In zahlreichen Studien der letzten Jahre konnten für EPO neuroprotektive und Neuroplastizität modulierende Effekte auf das ZNS gezeigt werden (DAME et al. 2001; CAMPANA u. MYERS 2003; MAIESE et al. 2004; OLSEN 2003; SHANG et al. 2007; WU et al. 2007). Die Vermittlung der EPO-assoziierten Effekte im ZNS geschieht zumindestens teilweise über EPO-Rezeptoren, die von neuronalen Vorläuferzellen exprimiert werden (SHINGO et al. 2001; CHEN et al. 2006). Die exakten Mechanismen und Faktoren, die an dieser

Vermittlung beteiligt sind, sind allerdings nicht bis ins Detail bekannt. Zahlreiche Untersuchungen weisen dem *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) in diesem Zusammenhang eine zentrale Funktion zu. So scheint EPO über eine Aktivierung des *cAMP response element-binding protein* (CREB) die BDNF-Expression und Produktion zu steigern (VIVIANI et al. 2005; ZHANG et al. 2006; SONMEZ et al. 2007; PILLAI et al. 2008). Schon seit geraumer Zeit ist bekannt, dass Neurotrophine wie BDNF als wichtige neuroprotektive Faktoren im ZNS agieren und die neuronale Plastizität entscheidend beeinflussen können (MARINI et al. 2004; LIPSKY u. MARINI 2007). Einerseits ist es möglich, dass Epotris über entsprechende Mechanismen die frühzeitig stattfindende Degeneration neuronaler Vorläuferzellen beeinflusste und damit eine überschießende Neubildung reduzierte. Allerdings ist es ebenso möglich, dass Epotris erst zu einem späteren Zeitpunkt die massive Proliferation neuronaler Vorläuferzellen einschränkte und auf ein Normalniveau regulierte. Um dies abschließend klären zu können, müssen weitere Versuchsansätze mit unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten durchgeführt werden. Eine Aussage über die Auswirkungen einer Epotris-Behandlung auf den Gesamtprozess der Epileptogenese ist basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit nicht möglich und muss ebenfalls in zukünftigen Untersuchungen geprüft werden. Diese Untersuchungen müssen in chronischen SE-Modellen durchgeführt werden, um eine Aussage über Effekte auf die Manifestation und den Schweregrad einer Epilepsie treffen zu können. Eine Epobis-Behandlung ließ keine Effekte auf die Induktion der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen erkennen. Epobis ist ein kürzlich entwickeltes EPO-mimetisches Peptid, das in *in vitro* Studien neuroprotektive Effekte zeigte. Unseres Wissens nach wurde Epobis bisher noch nicht in *in vivo* Studien getestet. Vielmehr wurde uns dieses Peptid von Prof. Bock aus eigenem Interesse an ersten *in vivo* Ergebnissen zur Verfügung gestellt. In den Untersuchungen dieser Arbeit konnten jedoch für Epobis keine neuroprotektiven Effekte bei einer anfallsassoziierten Neurodegeneration nachgewiesen werden. Für weitere Studien müssen demnach Änderungen an der Effektivität von Epobis vorgenommen werden.

Die Epo-mimetischen Peptide Epotris und Epobis schützen hilare Neurone nicht vor einer anfallsinduzierten Degeneration

Entsprechend früheren Daten (BRANDT et al. 2001; BRANDT et al. 2003) konnte gezeigt werden, dass ein elektrisch induzierter generalisierter SSSE mit einer starken Degeneration neuronaler Zellen im piriformen Cortex (PC) und in der Region des Ammonshorn (Cornu Ammonis, CA) einhergeht (Abb. 18 und Abb. 19). Des Weiteren war bei BLA-dauerstimulierten Tieren ein massiver Untergang hilarer Neurone zu beobachten (Abb. 20). Eine Epotris- bzw. Epobis-Behandlung verhinderte in keiner der untersuchten Gehirnregionen (Hilus, CA, PC) diesen deutlichen Neuronenuntergang. Lediglich im Hilus des Hippocampus wiesen Epotris behandelte Tiere tendenziell eine begrenzte Neurodegeneration auf. In dieser Gehirnregion unterschieden sich Epotris behandelte SE-Tiere im Ausmaß ihrer Neurodegeneration nicht signifikant von der entsprechenden Epotris-Kontrollgruppe. Die erzielten Daten sind kontrovers zu bisherigen Studien in denen ein neuroprotektiver Effekt für EPO-mimetische Peptide in verschiedenen Tiermodellen neurologischer Erkrankungen (z.B. Schlaganfall) postuliert wurde (DAME et al. 2001; CAMPANA u. MYERS 2003; MAIESE et al. 2004; SHANG et al. 2007; WU et al. 2007). Die Ursache für eine fehlende neuroprotektive Wirksamkeit von Epotris bzw. Epobis auf postmitotische Neurone scheint, unter Berücksichtigung sämtlicher Ergebnisse, zum einen modellabhängig zu sein zum anderen auf einer unzureichenden neuroprotektiven Funktion der Peptide zu beruhen. Das heißt, ein neuroprotektives Potential bezogen auf ausdifferenzierte Neurone liess sich für die uns zur Verfügung gestellten mimetischen Peptide nicht bestätigen. Die im elektrischen BLA-Modell durch Induktion eines generalisierten SE hervorgerufene massive Neurodegeneration war durch die neuroprotektive Eigenschaft der EPO-mimetischen Peptide nicht beeinflussbar.

Ausblick

Die Ergebnisse aus den beiden Versuchsansätzen (chemisches Pilocarpin-Modell/ elektrisches SE-BLA-Modell) belegen, dass das NCAM-mimetische Peptid Plannexin und das EPO-mimetische Peptid-Tetramer Epotris anfallsinduzierte Veränderungen auf neuronaler Ebene positiv beeinflussen können. In wie weit sich eine Behandlung mit Plannexin oder Epotris durch die beobachteten Effekte auf den Gesamtprozess der Epileptogenese auswirkt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Um dies

zu überprüfen, müssen weitere Untersuchungen in chronischen SE-Modellen durchgeführt werden. Chronische SE-Modelle erlauben eine Aussage über Effekte auf die Epileptogenese, insbesondere über Effekte auf die Manifestation und den Schweregrad einer Epilepsie. Die Ergebnisse dieser Studien dürften zuverlässige Erkenntnisse darüber liefern, ob NCAM- und EPO-mimetische Peptide eine neue Strategie für die Prophylaxe von Epilepsien darstellen könnten.

6.2 MODIFIKATION DER PGP-EXPRESSION MITTELS RNA-INTERFERENZ

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Arbeiten zur Untersuchung der Pgp-Expression in epileptischen Tieren und bei Humanpatienten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien belegen eine vermehrte Expression des Multidrug-Transporters Pgp im epileptischen Fokus pharmakoresistenter Tiere (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002, 2005) und pharmakoresistenter Epilepsiepatienten (DOMBROWSKI et al. 2001; SISODIYA et al. 2002; ARONICA et al. 2003). Derzeit geht man davon aus, dass es in Folge der Pgp-Überexpression zu einem erhöhten aktiven auswärtsgerichteten Transports der AEDs kommt. So kann die erforderliche AED-Wirkstoffkonzentration im Gehirnparenchym nicht erreicht werden und die Pharmakotherapie bleibt ohne Erfolg (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002, 2005). Unterschiedlichste Strategien wurden bereits verfolgt, um eine gesteigerte Aufnahme von Antiepileptika ins Gehirn zu erreichen (BAUER et al. 2005; LÖSCHER u. POTSCHKA 2005). Die Injektion von siRNA-Molekülen, die in den vergangenen Jahren als effektive Werkzeuge zur spezifischen Ausschaltung von Genen identifiziert wurden, könnte eine elegante Möglichkeit darstellen, eine vermehrte Expression der Transporter zu verhindern. Neben diversen *in vitro* Studien (CELIUS et al. 2004; STEGE et al. 2004; LEE u. SINKO 2006) beschreiben in jüngster Vergangenheit auch erste *in vivo* Versuche eine effiziente und spezifische „Downregulation“ von Leber-Pgp mittels RNA-Interferenz (RNAi) (KARAGIANNIS u. EL-OSTA 2005; MATSUI et al. 2005). Eine Inhibition der anfallsinduzierten Pgp-Hochregulation basierend auf dem Mechanismus der RNAi könnte folglich eine neue Strategie zur Steigerung der Antiepileptika-Aufnahme ins Gehirnparenchym und damit zur Überwindung der transporterbasierten Pharmakoresistenz darstellen.

Die Expression des Multidrug-Transporters Pgp bleibt durch eine zweimalige Applikation Pgp-gerichteter siRNA-Moleküle unbeeinflusst

In einem ersten Versuchsdurchgang wurde der Einfluss einer zweitägigen Behandlung mit zwei unterschiedlichen anti-Pgp siRNA-Molekülen (site 5m und site 10m) auf die Pgp-Expression untersucht. In diesem Versuchsansatz sollten verschiedene Fragestellungen beantwortet werden. Bis dato konnte eine Inhibition der Pgp-Expression in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke nur in *in vitro* Versuchen gezeigt werden. So sollte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersucht werden, ob der Mechanismus der RNAi *in vivo* ebenfalls eine Inhibition der Pgp-Expression in Endothelzellen bewirken kann. Es sollte weiterhin die Frage beantwortet werden, welche siRNA-Applikationsform unter Erhalt einer hohen Stabilität ihr Ziel am effizientesten erreicht. Außerdem war von Interesse, welche der beiden siRNA-Sequenzen zu einer wirkungsvolleren Pgp-Inhibition führen würde. Beide siRNA-Sequenzen, site 5m ausschließlich gerichtet gegen *mdr1a*-Pgp und site 10m gerichtet gegen *mdr1a* und *mdr1b*-Pgp, wurden an Hand von Literaturrecherchen ausgewählt (MATSUI et al. 2005). Das Ziel der Arbeitsgruppe von Matsui war eine Inhibition der Pgp-Expression in der Leber. Eine signifikante Herunterregulation von *mdr1a* mRNA in der Leber erzielte die Gruppe 24h nach der zweiten siRNA-Injektion. Im dem von uns erstellten Versuchsprotokoll wurden sechs Tiergruppen miteinander verglichen. Den Tieren wurde unverpackte siRNA (site 5m oder site 10m) bzw. Vehikellösung mittels der hydrodynamischen Methode (Kap. 4.2.3) und alternativ in Liposomen verpackte siRNA (site 5m oder site 10m) bzw. Leerliposomen verabreicht (Kap. 4.2.9.1). Die aufwendige Verpackung der siRNA-Moleküle in Liposomen wurde in der Vergangenheit von vielen Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt. Die Verpackung in Liposomen oder in andere *Carrier* dient zum einem dem Schutz der siRNA vor einem Abbau durch Nucleasen. Zum anderen wird durch die Bindung von Antikörpern an die Liposomenoberfläche eine bessere Zielsteuerung ermöglicht. In dem vorliegenden Versuchsansatz wurde das Peptid ApoE4 an die Oberfläche der Liposomen gebunden. ApoE4 bindet an LDL-Rezeptoren und Heparan-Sulfat-Proteoglykane auf Endothelzellen. Allerdings ist die Bindung nicht selektiv für Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, sondern für sämtliche Endothelzellen eines Organismus. Eine immunhistochemisch gestützte Quantifizierung der endothelialen Pgp-Expression an der Blut-Hirn-Schranke ergab keine Unterschiede in der Pgp-Expression der siRNA behandelten Tiere im Vergleich

zu den mit Vehikellösung bzw. mit Leerliposomen behandelten Kontrolltieren. Sowohl der Pgp-markierte prozentuale Flächenanteil der Gesamtfläche (Abb. 21 und 23) als auch dessen optische Dichte (Abb. 22 und 24) differierten in drei untersuchten Gehirnregionen (Hilus des Hippocampus, parietaler Cortex und piriformer Cortex) zwischen siRNA behandelten Tieren und Kontrolltieren nur geringgradig. Die aufwendige Verpackung der siRNA in Liposomen erwies sich gegenüber unverpackter siRNA nicht als vorteilhaft. Ursächlich hierfür können eine unzureichende *in vivo* Stabilität der hergestellten Liposomen oder eine ungenügende bzw. fehlerhafte AK-Bindung und somit eine unbefriedigende Zielsteuerung der Liposomen sein. In diesem zweitägigen Versuchsansatz führte demnach weder die Behandlung mit unverpackter noch mit in Liposomen verpackter siRNA zu einer quantifizierbaren Reduktion der Pgp-Expression. Die primäre Frage bei der Suche nach einer Erklärung ist sicherlich, ob ausreichend intakte siRNA in die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke gelangen konnte. Eine naheliegende Erklärung könnte eine zu niedrige Dosierung der siRNA sein. Die Dosierung von 50 µg unverpackter siRNA bzw. 31 µg in Liposomen verpackter siRNA pro Tier wurde von uns zu Versuchsbeginn in Anlehnung an bereits beschriebene *in vivo* Studien ausgewählt (DE FOUGEROLLES et al. 2005; MATSUI et al. 2005). In diesen *in vivo* Arbeiten wurde eine signifikante Genexpressionshemmung schon mit einer Dosierung im Mikrogramm-Bereich verzeichnet. Die in den vorliegenden Untersuchungen gewählte geringere Dosierung bei der Verabreichung in Liposomen verpackter siRNA ergibt sich aus dem, vor einem Abbau durch Nucleasen, schützenden Effekt der Liposomen. Allerdings muß gestützt auf die vorliegenden Ergebnisse überlegt werden, ob die Dosierung und Behandlungsdauer dem Ziel der Untersuchungen hätte angepasst werden müssen. Abweichend von bisherigen *in vivo* Studien sollte im vorliegenden Versuchsansatz die Pgp-Expression nicht auf mRNA-Ebene, sondern mit einem von uns etablierten Auswertesystem, immunhistochemisch auf Proteinebene ausgewertet werden. Zudem sollte in diesem Versuchsansatz erstmalig versucht werden eine Inhibition der Pgp-Expression im Gehirn zu erreichen. Die natürliche Barriere der Blut-Hirn-Schranke schützt auf der einen Seite das Gehirn vor schädlichen Substanzen, macht jedoch auf der anderen Seite das Gehirn zu einem schlecht bzw. schwer erreichbaren Zielgewebe. Es ist durchaus möglich, dass es uns mit der, in Anlehnung an andere Studien gewählten Dosierung und Behandlungsdauer nicht gelungen ist, eine anhand der

Proteinkonzentration detektierbare Pgp-Expressionshemmung zu erreichen. Des Weiteren ist es denkbar, dass eine Expressionshemmung mit dem verwendeten Versuchsdesign stattgefunden hat, die allerdings zum Untersuchungszeitpunkt auf Proteinebene nicht erkennbar war. In die Wahl des richtigen Untersuchungszeitpunktes müssen viele wichtige Faktoren miteinbezogen werden. Von großer Bedeutung ist, dass mittels RNAi nur die Expression von nicht bereits synthetisiertem Pgp gehemmt werden kann. Bereits exprimiertes Pgp oder in Vesikeln gelagertes Pgp bleibt unbeeinflusst. Folglich kann im vorliegenden Versuchsansatz durchaus eine Inhibition der Pgp-Expression auf mRNA-Ebene stattgefunden haben, die jedoch durch noch vorhandenes, bereits synthetisiertes Pgp auf Proteinebene nicht ausreichend darstellbar war. Im Anschluss an diesen zweitägigen Versuchsansatz wurde eine zweite Studie durchgeführt. In dieser wurde die Behandlungsdauer von zwei auf vier Tage verlängert und sowohl die siRNA-Dosis als auch die Applikationsanzahl erhöht. Zudem erfolgte eine Quantifizierung der Pgp-Expression immunhistochemisch auf Proteinebene und zusätzlich mittels Real-Time PCR auf mRNA Ebene.

Eine tägliche Applikation unverpackter siRNA über vier aufeinanderfolgende Tage führt zu einer Reduktion von Pgp auf Protein- nicht aber auf mRNA-Ebene

Im zweiten Versuchsdurchgang wurde die Dosierung der siRNA dem neuen viertägigen Behandlungsprotokoll angepasst und um 25% auf 62,5 µg/Tier erhöht. Die Applikation der siRNA erfolgte in diesem Versuchsansatz einmal täglich über vier aufeinanderfolgende Tage intravenös mittels der hydrodynamischen Methode (Kap. 4.2.3). Bei der Auswahl der Applikationsform wurde auf die aufwendige, sich nicht als vorteilhaft erwiesene, Verpackung der siRNA in Liposomen verzichtet. So wurde in diesem Versuchsansatz nur unverpackte siRNA appliziert. Da in Endothelzellen vorrangig *mdr1a* Pgp exprimiert wird, wurde in diesem Versuchsansatz lediglich die gegen *mdr1a* gerichtete siRNA site 5m eingesetzt. Die Quantifizierung der endothelialen Pgp-Expression auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Färbung ergab eine signifikante Reduktion der Pgp-Expression im hippocampalen Hilus und im parietalen Cortex. In diesen Regionen war der Pgp-markierte prozentuale Flächenanteil der Gesamtfläche bei siRNA behandelten Tieren signifikant geringer als bei Vehikel behandelten Tieren (Abb. 25 und 26). So konnte im Hilus eine Reduktion der Pgp-Expression von 31% und im parietalen Cortex von

16% erreicht werden. Im piriformen Cortex ergab die Auswertung des Pgp-markierten prozentualen Flächenanteils der Gesamtfläche keine signifikanten Differenzen zwischen siRNA behandelten und Vehikel behandelten Tieren. Die optische Dichte der Pgp-markierten Fläche unterschied sich zwischen behandelten Tieren und Kontrolltieren in keiner der drei Gehirnregionen signifikant (Abb. 27). Basierend auf früheren Studien (VOLK et al. 2004; VOLK et al. 2005) ist davon auszugehen, dass die ausschlaggebende Größe zur Quantifizierung der Pgp-Expression der Pgp-markierte prozentuale Flächenanteil der Gesamtfläche ist. So kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass in diesem viertägigen Versuchsansatz durch eine höhere siRNA Dosis (höhere Dosierung, verdoppelte Applikationsanzahl) eine Inhibition der Pgp-Expression erreicht werden konnte. Die Notwendigkeit einer höheren Dosierung von anti-Pgp siRNA könnte sich aus einer streng reglementierten und nur schwer beeinflussbaren Regulation der Pgp-Expression an der Blut-Hirn-Schranke ergeben. Dies würde die zentrale Funktion von Pgp beim Schutz des Gehirns vor unerwünschten Substanzen unterstreichen. Unterschiede im Ausmaß der Inhibition der Pgp-Expression zwischen Gehirnregionen mit signifikanter Herunterregulation (Hilus, parietaler Cortex) bzw. das Verfehlen einer signifikanten Herunterregulation in anderen Gehirnregionen (piriformer Cortex) basiert wahrscheinlich auf Unterschieden in der Erreichbarkeit dieser Regionen für siRNA-Moleküle. Zur Verifizierung der immunhistochemischen Ergebnisse wurden im direkten Anschluss Real-Time PCR-Untersuchungen von Gehirn- und Lebergewebe der Tiere durchgeführt. Allerdings ergab die Quantifizierung der Pgp-Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-Time PCR sowohl im Gehirn (Abb. 28) als auch in der Leber (Abb. 29) keine signifikanten Unterschiede zwischen siRNA behandelten Tieren und mit Vehikellösung behandelten Kontrolltieren.

Ein naheliegender Grund für diese abweichenden Befunde ist die Tatsache, dass eine Expressionsinhibition erfolgt ist, die zum gewählten Untersuchungszeitpunkt nur auf Proteinebene jedoch nicht mehr auf mRNA-Ebene detektierbar war. Im vorliegenden Versuchsansatz wurde demnach zu einem frühen Zeitpunkt die Pgp-Synthese auf Grund fehlender, durch RISC abgebauter, mRNA inhibiert. Zum gewählten Untersuchungszeitpunkt wurde die Pgp-Transkription allerdings nicht mehr durch einen RISC-vermittelten mRNA-Abbau behindert und eine Synthese von Pgp fand bereits wieder statt. Jedoch war zum Untersuchungszeitpunkt die Pgp-Expression noch nicht wieder auf ihrem Ausgangsniveau und noch so weit reduziert,

dass quantitative Unterschiede zwischen siRNA und Vehikel behandelten Tieren erfassbar waren. Ursächlich für die frühzeitige Abnahme der RNAi-Effizienz ist höchstwahrscheinlich eine sehr schnelle Konzentrationsabnahme intakter siRNA-Moleküle in den Endothelzellen. Anzunehmen ist, dass mit der gewählten Dosierung und Applikationsform lediglich eine geringe Menge intakter siRNA in die Endothelzellen gelangen konnte, die nur für sehr kurze Zeit den Abbau der mRNA-Moleküle bewirken konnte. Bereits wenige Stunden nach Applikation der siRNA-Moleküle, war deren Konzentration in den Endothelzellen so weit gesunken, dass die Grundvoraussetzungen für eine effiziente RNAi nicht mehr gegeben waren. Bei den Überlegungen bezüglich der Ursachen für eine schnelle Abnahme der RNAi-Effizienz, muss allerdings berücksichtigt werden, dass eine Hemmung des RNAi-Mechanismus ferner durch eine Übersättigung des zellulären RNAi-Apparates nach siRNA-Überdosierung hervorgerufen werden kann (UPRICHARD 2005). Daher ist eingehend zu überprüfen, ob eine Unter- oder Überdosierung für den frühzeitigen Abbruch der RNAi verantwortlich war.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der immunhistochemischen Pgp-Quantifizierung, dass mit dem durchgeführten Versuchsansatz eine RNA-Interferenz in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke stattgefunden hat. Somit konnte im Rahmen dieses Dissertationsverfahren erstmalig eine Pgp-Expressioninhibition mittels RNAi in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke im Tiermodell erreicht werden. Vermutlich hielt die Aktivierung des RISC und damit ein Abbau der mRNA-Moleküle jedoch nur kurze Zeit an, so dass zum Untersuchungszeitpunkt eine Quantifizierung der Pgp-Expression auf mRNA-Ebene durch eine Real-Time PCR sowohl in Gehirn- als auch in Lebergewebe keine signifikanten Unterschiede zwischen siRNA behandelten Tieren und Kontrolltieren ergab.

Ausblick

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Quantifizierung der Pgp-Expression lassen die Vermutung zu, dass der Mechanismus der RNAi generell zur Inhibition der Pgp-Genexpression in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke und damit als mögliche Strategie zur Steigerung der Antiepileptika-Aufnahme ins Gehirnparenchym geeignet ist. Allerdings müssen zur Bestätigung der Resultate im Anschluss weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die die günstigsten Applikationsintervalle und Dosierungen der siRNA für eine langanhaltende und effektive Hemmung der Gen-

als auch der Proteinexpression erkennen lassen. Hierfür könnten ergänzende Untersuchungen mittels Western-Blot-Technik hilfreich sein. Zudem sollte die Dosierung sowie die Applikationsanzahl und Behandlungsdauer eingehend überprüft werden. In einem anschließenden Schritt müsste eine Optimierung der '*Delivery*' erfolgen. Die in dieser Arbeit erreichte Herunterregulation von Pgp im Hilus des Hippocampus von 31% und im parietalen Cortex von 16% könnte bereits ausreichend sein, um die Pgp-blockierte Arzneimittelpenetration bei milden pathophysiologischen Schädigungen zu verbessern. Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass es infolge täglicher minimaler elektrischer Stimuli wie z.B. im Amygdala-Kindling-Modell zu einer Induktion der Pgp-Expression von bis zu 22% kommt (VOLK et al. 2004). Es ist jedoch davon auszugehen, dass eine Induktion der Pgp-Expression hervorgerufen durch schwere Insulte wie z.B. einen SE oder einen Schlaganfall mit diesem Versuchsdesign nicht kontrollierbar ist. In entsprechenden Tiermodellen wurden Steigerungen der Pgp-Expression von bis zu 70-80% beobachtet (VOLK et al. 2004; SPUDICH et al. 2006). Aus diesen Ergebnissen ergibt sich unweigerlich die Notwendigkeit einer Optimierung der Effizienz der siRNA-Moleküle durch eine Verbesserung der '*Delivery*'. Die hydrodynamische intravenöse Applikation ist für erste experimentelle Untersuchungen zur Überprüfung des generellen Potentials der RNAi, wie in dieser Arbeit, sehr zweckmäßig. Als Behandlungsmethode für den Humanpatienten ist sie in dieser Form ungeeignet. Falls sich in zukünftigen Studien eine effizientere und praktikablere Strategie validieren läßt, könnte in einem nächsten Schritt die Eignung der RNAi als Behandlungsstrategie zur Überwindung transporterbasierter Pharmakoresistenzen in einem Tiermodell für pharmakoresistente Epilepsien überprüft werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Christina Fuest

Experimentelle Prüfung neuer Strategien für die Therapie und Prophylaxe von Epilepsien

Epilepsien sind die häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen bei Hund, Katze und Mensch. Die bedeutendste Therapieform von Epilepsien ist die langfristige, kausale Pharmakotherapie mit dem Ziel der Anfallsreduktion bzw. Anfallssuppression. Diese zumeist lebenslang andauernde Behandlung mit Antiepileptika ist häufig mit schweren Nebenwirkungen verbunden und kann zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität und Lebenserwartung der Veterinär- und Humanpatienten führen. Aus diesen Gründen wäre eine prophylaktische, antiepileptogene Therapie, die die Entstehung von Epilepsien verhindert, wünschenswert. Die Mehrzahl der Epilepsien wird durch symptomatische Ursachen, wie Schädelhirntraumen oder Schlaganfälle bedingt. Diese initialen Insulte verursachen in der Folge die Generierung eines neuronalen Netzwerkes, das die Manifestation einer Epilepsie begünstigt. Die genauen Mechanismen der Entstehung symptomatischer Epilepsien sind bislang noch weitgehend ungeklärt. Folglich ist ein konkreter Ansatz zur Entwicklung einer Prophylaxe nicht möglich. Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahren gaben Hinweise, dass Veränderungen der neuronalen Plastizität insbesondere massive Neuronenverluste sowie eine gestörte Neuronenneubildung eine zentrale Bedeutung im Rahmen der Epileptogenese einnehmen könnten. Im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Untersuchungen, sollten dazu beitragen, die Mechanismen der Epilepsieentstehung besser zu verstehen und im Weiteren neue Ansätze zur Entwicklung einer antiepileptogenen bzw. erkrankungsmodifizierenden Therapie aufzuzeigen. Bisherige Forschungsarbeiten bestätigen eine Modulatorfunktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) und des Hormons Erythropoetin (EPO) für die neuronale Plastizität. Auf Grund dessen wurden in dieser Arbeit die Effekte des NCAM-mimetischen Peptids *Plannexin* sowie der beiden EPO-mimetischen Peptide *Epotris* und *Epobis* auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen, insbesondere auf neurodegenerative Vorgänge und auf die Neubildung von Neuronen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen konnten eine modulierende Funktion des NCAM-mimetischen Peptids *Plannexin* und des EPO-mimetischen Peptids *Epotris* auf die neuronale Plastizität insbesondere auf die anfallsinduzierte gestörte Neuronenneubildung demonstrieren. Eine Behandlung mit *Plannexin* bewirkte eine weitgehende Reduktion der unmittelbar SE-assoziierten Degeneration neuronaler Vorläuferzellen und reduzierte signifikant die Manifestation persistierender basaler Dendriten. *Epotris* reduzierte die, aller Wahrscheinlichkeit nach als Folge der Degeneration zu einem späteren Zeitpunkt auftretende, überschießende Proliferation neuronaler Vorläuferzellen. In wie weit eine *Plannexin*- oder *Epotris*-Behandlung den Gesamtprozess der Epileptogenese beeinflusst, wurde in dieser Arbeit nicht geklärt. Um diese Frage zukünftig beantworten zu können, müssen Studien in chronischen Epilepsiemodellen durchgeführt werden. Mittels dieser Modelle lassen sich Effekte auf die Manifestation und den Schweregrad einer Epilepsie sehr gut überprüfen. Anhand der Ergebnisse aus diesen Untersuchungen könnte dann eine Aussage über das therapeutische Potential von *Plannexin* und *Epotris* als antiepileptogene oder erkrankungsmodifizierende Substanz getroffen werden. Der jüngst entwickelte EPO-Abkömmling *Epobis*, der von uns erstmals in *in vivo* Versuchen getestet wurde, hatte keinen Effekt auf anfallsinduzierte neuronale Veränderungen. Für weitere Studien müssen demnach Änderungen an der Effektivität von *Epobis* vorgenommen werden.

Die dringende Notwendigkeit einer prophylaktischen Therapie ergibt sich vor allem aus der Tatsache, dass ungeachtet einer Vielzahl von Antiepileptika in der Tier- und Humanmedizin etwa ein Drittel aller Veterinär- und Humanpatienten nicht auf eine Pharmakotherapie anspricht. Diese pharmakoresistente Form der Epilepsie stellt ein gravierendes, bisher ungelöstes Problem dar und geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Verschiedene Studien der letzten Jahre belegen, dass dem Phänomen der Pharmakoresistenz ein multifaktorieller Prozess zu Grunde liegt. Als eine Ursache für das Auftreten von Pharmakoresistenzen bei Epilepsiepatienten wird eine Überexpression verschiedener sogenannter Multidrug-Transporter diskutiert. Diese in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke lokalisierten Effluxtransporter, limitieren im physiologischen Zustand aktiv eine Akkumulation lipophiler Substanzen im Gehirnparenchym. Bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten führt eine Überexpression der Transporter an der Blut-Hirn-Schranke zu einem erhöhten Rücktransport der eingesetzten Antiepileptika in die Blutbahn. So wird trotz einer

ausreichenden Plasma-Konzentrationen nicht die therapeutisch benötigte Wirkstoffkonzentration im Bereich des epileptischen Fokus erreicht. Dem Multidrug-Transporter P-Glycoprotein (Pgp) wird im Zusammenhang mit transporterbasierten Pharmakoresistenzen bei Epilepsien eine besondere Bedeutung beigemessen. Basierend auf der Multidrug-Transporter-Hypothese sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob sich der Mechanismus der RNA-Interferenz zur Inhibition der Pgp-Expression *in vivo* eignet und im Weiteren welche *in vivo*-Applikationsmethode die effizienteste ist. Im Rahmen dieser Dissertation konnte anhand unterschiedlicher Versuchsansätze erstmals *in vivo* gezeigt werden, dass eine Reduktion der Pgp-Expression in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke mittels RNA-Interferenz möglich ist. Als effektivste Applikationsmethode erwies sich die intravenöse Injektion unverpackter anti-Pgp siRNA mittels der hydrodynamischen Methode über vier aufeinanderfolgende Tage. Eine lediglich zweitägige Behandlungsdauer sowie die Verpackung der siRNA in *Carrier* führte zu keiner immunhistochemisch quantifizierbaren Reduktion der Pgp-Expression. Somit ist es mit diesem Dissertationsvorhaben gelungen, den Grundstein für aufbauende Untersuchungen in chronischen Epilepsiemodellen zu legen. Es ist zu erwarten, dass die Ergebnisse aus Studien in chronischen Modellen eine Aussage darüber ermöglichen, ob der Mechanismus der RNA-Interferenz zur Steigerung der Antiepileptika-Aufnahme ins Gehirnparenchym und damit als neuartige Behandlungsstrategie für resistente Epilepsiepatienten geeignet ist. Dies wäre ein bedeutsamer Erfolg auf der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten für Patienten mit pharmakorefraktärer Epilepsie.

8 SUMMARY

Christina Fuest

Development of new strategies for the therapy and prophylaxis of epilepsies

Epilepsy is the most common chronic neurological disease in small animals (i.e. dogs and cats) and in humans. In epilepsy, first choice treatment is focused on suppressing seizure activity. The chronic, lifelong administration of antiepileptic drugs is often associated with severe side effects. Thus, there is a pressing need for a prophylactic therapy preventing the development of epilepsy or altering its natural course.

Epilepsy often originates from a symptomatic cause like stroke or head trauma. These initial insults induce the generation of an epileptic network. Despite progress in understanding the pathogenesis of epilepsy, the mechanisms underlying symptomatic epilepsy are only incompletely understood. Therefore, a specific and rational approach for an antiepileptogenic therapy is lacking. However, there is evidence, that changes in neuronal plasticity due to imbalanced generation of new neurons and massive neuronal cell loss contribute to the development and progression of an epileptic network. One aim of this doctoral thesis was to provide new insights in the mechanisms underlying the progression of epilepsy and furthermore to identify new effective strategies that are able to affect epilepsy-associated neuronal changes.

Recent studies demonstrate the relevance of the neuronal cell adhesion molecule (NCAM) and of the glycoprotein hormone erythropoietin (EPO) to neuronal plasticity and neuroprotection. For this reason the effects of the NCAM-mimetic peptide *plannexin* and of the erythropoietin-mimetics *epotris* and *epobis* on neuronal plasticity were studied. The study focussed on seizure-induced hippocampal cell loss and alterations of hippocampal neurogenesis which have been hypothesized to contribute to the development and progression of epilepsy. It was demonstrated that the NCAM-mimetic peptide *plannexin* and the EPO-mimetic *epotris* modulate neuronal plasticity in particular altering hippocampal neurogenesis. *Plannexin* partially protected neuronal progenitor cells from SE-induced degeneration and decreased seizure-associated alteration of hippocampal neurogenesis such as the generation of persistent basal dendrites. The SE-associated degeneration of neuronal progenitor

cells is thought to trigger a massive proliferation of progenitor cells at a later timepoint. *Epotris* treatment reduced the subsequent increase of neuronal progenitor cells. Whether the NCAM-mimetic *plannexin* as well as the EPO-mimetic peptide *epotris* are suitable therapeutics for an antiepileptogenic therapy was not finally clarified. In order to answer this question, future studies in chronic epilepsy models have to be performed. The recently designed EPO-mimetic *epobis* failed to show efficiency *in vivo* activity.

The urgent need for a prophylactic therapy preventing epilepsy arises from the fact that despite the variety of antiepileptic drugs in veterinary and human medicine about one third of patients suffering from epilepsy is resistant to current pharmacotherapies. Refractory epilepsy remains a major, unsolved problem and may be associated with severe consequences, including shortened lifespan, psychiatric impairment and social disability. The mechanisms underlying pharmacoresistance are likely to be multifactorial. There is cumulating evidence that overexpression of multidrug transporters at the blood-brain barrier contributes to drug-refractoriness by limiting the penetration of antiepileptic drugs to their target sites. These transporters act as efflux transporters and protect the brain from intoxication by lipophilic xenobiotics. In pharmacoresistant patients overexpression of multidrug transporters causes increased efflux transport resulting in a reduced amount of antiepileptic drugs reaching the epileptic tissue. The multidrug transporter P-glycoprotein (Pgp) seems to be the most important one in association with pharmacoresistance in epilepsy. Inhibition of MDTs may render a new strategy to overcome transporter-based pharmacoresistance. Therefore, it was tested whether Pgp expression can be downregulated using RNA interference (RNAi) and additionally which mode of administration is the most efficacious. It was demonstrated that a reduction of Pgp expression in endothelial cells can be achieved by RNAi. This was attained by intravenous administration of naked anti-Pgp siRNA for four days. A two day treatment with naked siRNA or siRNA encapsulated in liposomes did not result in an immunohistochemically detectable Pgp downregulation. The results render the basis for future studies aiming to answer the question if the concentration of antiepileptic drugs in the brain can be increased by a RNAi mediated inhibition of Pgp.

9 LITERATURVERZEICHNIS

ANDRE, V., C. DUBE, J. FRANCOIS, C. LEROY, M. A. RIGOULOT, C. ROCH, I. J. NAMER u. A. NEHLIG (2007):

Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model.
Epilepsia 48 Suppl 5, 41-47

ARONICA, E., J. A. GORTER, G. H. JANSEN, C. W. VAN VEELLEN, P. C. VAN RIJEN, S. LEENSTRA, M. RAMKEMA, G. L. SCHEFFER, R. J. SCHEPER u. D. TROOST (2003):

Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors.

Neuroscience 118, 417-429

BARAN, H., M. GRAMER, D. HONACK u. W. LÖSCHER (1995):

Systemic administration of kainate induces marked increases of endogenous kynurenic acid in various brain regions and plasma of rats.

Eur J Pharmacol 286, 167-175

BARTESAGHI, S., M. MARINOVICH, E. CORSINI, C. L. GALLI u. B. VIVIANI (2005):

Erythropoietin: a novel neuroprotective cytokine.

Neurotoxicology 26, 923-928

BAUER, B., A. M. HARTZ, G. FRICKER u. D. S. MILLER (2005):

Modulation of p-glycoprotein transport function at the blood-brain barrier.

Exp Biol Med 230, 118-127

BAUER, B., A. M. HARTZ, A. PEKCEC, K. TOELLNER, D. S. MILLER u. H. POTSCHKA (2008):

Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling.

Mol Pharmacol 73, 1444-1453

BEN-ARI, Y., E. TREMBLAY, D. RICHE, G. GHILINI u. R. NAQUET (1981):

Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy.

Neuroscience 6, 1361-1391

BENGZON, J., Z. KOKAIA, E. ELMER, A. NANOBASHVILI, M. KOKAIA u. O. LINDVALL (1997):

Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures.

Proc Natl Acad Sci 94, 10432-10437

BERENDT, M. u. L. GRAM (1999):

Epilepsy and seizure classification in 63 dogs: a reappraisal of veterinary epilepsy terminology.

J Vet Intern Med 13, 14-20

BEREZIN, V. u. E. BOCK (2004):

NCAM mimetic peptides: Pharmacological and therapeutic potential.

J Mol Neurosci 22, 33-39

BERNAUDIN, M., H. H. MARTI, S. ROUSSEL, D. DIVOUX, A. NOUVELOT, E. T. MACKENZIE u. E. PETIT (1999):

A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice.

J Cereb Blood Flow Metab 19, 643-651

BOADO, R. J. (2005):

RNA interference and nonviral targeted gene therapy of experimental brain cancer.

NeuroRx 2, 139-150

BRANDT, C., K. BETHMANN, A. M. GASTENS u. W. LÖSCHER (2006a):

The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy.

Neurobiol Dis 24, 202-211

BRANDT, C., A. M. GASTENS, M. SUN, M. HAUSKNECHT u. W. LÖSCHER (2006b):

Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats.

Neuropharmacology 51, 789-804

BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCHKA, H. VOLK u. W. LÖSCHER (2003):

Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats.

Epilepsy Res 55, 83-103

BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCHKA, U. EBERT u. W. LÖSCHER (2001):

Recurrent spontaneous seizures and brain lesions after prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats.

Epilepsia 42, 232

BRENNEKE, F., O. BUKALO, A. DITYATEV u. A. A. LIE (2004):

Mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-r show physiological and structural hallmarks of increased hippocampal excitability, but no increased susceptibility to seizures in the pilocarpine model of epilepsy.

Neuroscience 124, 841-855

BROWNE, T. R. u. G. L. HOLMES (2001):

Epilepsy.

N Engl J Med 344, 1145-1151

- BUCKMASTER, P. S., G. F. ZHANG u. R. YAMAWAKI (2002):
Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit.
J Neurosci 22, 6650-6658
- CAMPANA, W. M. u. R. R. MYERS (2003):
Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury.
Eur J Neurosci 18, 1497-1506
- CAVALHEIRO, E. A., J. P. LEITE, Z. A. BORTOLOTO, W. A. TURSKI, C. IKONOMIDOU u. L. TURSKI (1991):
Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures.
Epilepsia 32, 778-782
- CELIK, M., N. GOKMEN, S. ERBAYRAKTAR, M. AKHISAROGLU, S. KONAKC, C. ULUKUS, S. GENC, K. GENC, E. SAGIROGLU, A. CERAMI u. M. BRINES (2002):
Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury.
Proc Natl Acad Sci U S A 99, 2258-2263
- CELIUS, T., P. GARBERG u. B. LUNDGREN (2004):
Stable suppression of MDR1 gene expression and function by RNAi in Caco-2 cells.
Biochem Biophys Res Commun 324, 365-371
- CHA, B. H., C. AKMAN, D. C. SILVEIRA, X. LIU u. G. L. HOLMES (2004):
Spontaneous recurrent seizure following status epilepticus enhances dentate gyrus neurogenesis.
Brain Dev 26, 394-397
- CHANDLER, K. u. H. VOLK (2008):
Seizures: Intracranial or extracranial disease?
In Practice 30, 366-370+372-373
- CHAZAL, G., P. DURBEC, A. JANKOVSKI, G. ROUGON u. H. CREMER (2000):
Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse.
J Neurosci 20, 1446-1457
- CHECK, E. (2005):
A crucial test.
Nat Med 11, 243-244
- CHEN, Z. Y., R. WARIN u. C. T. NOGUCHI (2006):
Erythropoietin and normal brain development: receptor expression determines multi-tissue response.
Neurodegener Dis 3, 68-75

- CHONG, Z. Z., J. Q. KANG u. K. MAIESE (2002):
Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases.
Circulation 106, 2973-2979
- CLIFFORD, D. B., J. W. OLNEY, A. MANIOTIS, R. C. COLLINS u. C. F. ZORUMSKI (1987):
The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures.
Neuroscience 23, 953-968
- CLINCKERS, R., I. SMOLDERS, A. MEURS, G. EBINGER u. Y. MICHOTTE (2005):
Quantitative in vivo microdialysis study on the influence of multidrug transporters on the blood-brain barrier passage of oxcarbazepine: concomitant use of hippocampal monoamines as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant activity.
J Pharmacol Exp Ther 314, 725-731
- CRESPEL, A., V. RIGAU, P. COUBES, M. C. ROUSSET, F. DE BOCK, H. OKANO, M. BALDY-MOULINIER, J. BOCKAERT u. M. LERNER-NATOLI (2005):
Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy.
Neurobiol Dis 19, 436-450
- CUCULLO, L., M. HOSSAIN, E. RAPP, T. MANDERS, N. MARCHI u. D. JANIGRO (2007):
Development of a humanized in vitro blood-brain barrier model to screen for brain penetration of antiepileptic drugs.
Epilepsia 48, 505-516
- CZAPP, M., J. P. BANKSTAHL, G. ZIBELL u. H. POTSCHKA (2008):
Brain penetration and anticonvulsant efficacy of intranasal phenobarbital in rats.
Epilepsia 49, 1142-1150
- CZAUDERNA, F., M. FECHTNER, S. DAMES, H. AYGUN, A. KLIPPEL, G. J. PRONK, K. GIESE u. J. KAUFMANN (2003):
Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells.
Nucleic Acids Res 31, 2705-2716
- DALBY, N. O. u. I. MODY (2001):
The process of epileptogenesis: a pathophysiological approach.
Curr Opin Neurol 14, 187-192
- DAME, C., S. E. JUUL u. R. D. CHRISTENSEN (2001):
The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential.
Biol Neonate 79, 228-235
- DANO, K. (1973):
Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells.
Biochim Biophys Acta 323, 466-483

DASHTIPOUR, K., A. M. WONG, A. OBENAU, I. SPIGELMAN u. C. E. RIBAK (2003):

Temporal profile of hilar basal dendrite formation on dentate granule cells after status epilepticus.

Epilepsy Res 54, 141-151

DE BOER, A. G., I. C. VAN DER SANDT u. P. J. GAILLARD (2003):

The role of drug transporters at the blood-brain barrier.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 43, 629-656

DE FOUGEROLLES, A., M. MANOHARAN, R. MEYERS u. H. P. VORNLOCHER (2005):

RNA interference in vivo: toward synthetic small inhibitory RNA-based therapeutics.

Methods Enzymol 392, 278-296

DE MARTIMPREY, H., J. R. BERTRAND, A. FUSCO, M. SANTORO, P. COUVREUR, C. VAUTHIER u. C. MALVY (2008):

siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma.

Nucleic Acids Res 36

DECKER, L., P. DURBEC, G. ROUGON u. A. B. EVERCOOREN (2002):

Loss of polysialic residues accelerates CNS neural precursor differentiation in pathological conditions.

Mol Cell Neurosci 19, 225-238

DEMEULE, M., A. REGINA, J. JODOIN, A. LAPLANTE, C. DAGENAIS, F. BERTHELET, A. MOGHRABI u. R. BELIVEAU (2002):

Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier.

Vascul Pharmacol 38, 339-348

DEWEY, C. W., R. GUILIANO, D. M. BOOTHE, J. M. BERG, G. D. KORTZ, R. J. JOSEPH u. S. C. BUDSBERG (2004):

Zonisamide therapy for refractory idiopathic epilepsy in dogs.

J Am Anim Hosp Assoc 40, 285-291

DIGICAYLIOGLU, M. u. S. A. LIPTON (2001):

Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades.

Nature 412, 641-647

DITLEVSEN, D. K., L. B. KOHLER, V. BEREZIN u. E. BOCK (2007):

Cyclic guanosine monophosphate signalling pathway plays a role in neural cell adhesion molecule-mediated neurite outgrowth and survival.

J Neurosci Res 85, 703-711

DOHERTY, P., P. SMITH u. F. S. WALSH (1996):

Shared cell adhesion molecule (CAM) homology domains point to CAMs signalling via FGF receptors.

Perspect Dev Neurobiol 4, 157-168

DOHERTY, P. u. F. S. WALSH (1996):

CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth.

Mol Cell Neurosci 8, 99-111

DOMBROWSKI, S. M., S. Y. DESAI, M. MARRONI, L. CUCULLO, K. GOODRICH, W. BINGAMAN, M. R. MAYBERG, L. BENGEZ u. D. JANIGRO (2001):

Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy.

Epilepsia 42, 1501-1506

DORN, G., S. PATEL, G. WOTHERSPOON, M. HEMMINGS-MIESZCZAK, J. BARCLAY, F. J. NATT, P. MARTIN, S. BEVAN, A. FOX, P. GANJU, W. WISHART u. J. HALL (2004):

siRNA relieves chronic neuropathic pain.

Nucleic Acids Res 32, 49

DOYLE, E., P. M. NOLAN, R. BELL u. C. M. REGAN (1992):

Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat.

J Neurochem 59, 1570-1573

DUBE, C., S. BOYET, C. MARESCAUX u. A. NEHLIG (2001):

Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat.

Exp Neurol 167, 227-241

DUDEK, F. E., J. L. HELLIER, P. A. WILLIAMS, D. J. FERRARO u. K. J. STALEY (2002):

The course of cellular alterations associated with the development of spontaneous seizures after status epilepticus.

Prog Brain Res 135, 53-65

DYKXHOORN, D. M. u. J. LIEBERMAN (2006a):

Knocking down disease with siRNAs.

Cell 126, 231-235

DYKXHOORN, D. M. u. J. LIEBERMAN (2006b):

Running interference: prospects and obstacles to using small interfering RNAs as small molecule drugs.

Annu Rev Biomed Eng 8, 377-402

EHRENREICH, H., M. HASSELBLATT, C. DEMBOWSKI, L. CEPEK, P. LEWCZUK, M. STIEFEL, H. H. RUSTENBECK, N. BREITER, S. JACOB, F. KNERLICH, M. BOHN, W. POSER, E. RUTHER, M. KOCHEN, O. GEFELLER, C. GLEITER, T. C. WESSEL, M. DE RYCK, L. ITRI, H. PRANGE, A. CERAMI, M. BRINES u. A. L. SIREN (2002):

Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial.

Mol Med 8, 495-505

- ELBASHIR, S. M., J. HARBORTH, W. LENDECKEL, A. YALCIN, K. WEBER u. T. TUSCHL (2001):
Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.
Nature 411, 494-498
- FEDOROV, Y., E. M. ANDERSON, A. BIRMINGHAM, A. REYNOLDS, J. KARPILOW, K. ROBINSON, D. LEAKE, W. S. MARSHALL u. A. KHVOROVA (2006):
Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype.
RNA 12, 1188-1196
- FIRE, A., S. XU, M. K. MONTGOMERY, S. A. KOSTAS, S. E. DRIVER u. C. C. MELLO (1998):
Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.
Nature 391, 806-811
- FISHER, R. S., W. VAN EMDE BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON, P. LEE u. J. ENGEL, JR. (2005):
Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).
Epilepsia 46, 470-472
- FOLDVARY, N., W. E. BINGAMAN u. E. WYLLIE (2001):
Surgical treatment of epilepsy.
Neurol Clin 19, 491-515
- FRANKLIN, K. B. J. u. G. PAXINOS (2004):
The mouse brain in stereotactic coordinates.
Academic Press, Sydney
- FROMM, M. F. (2000):
P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs.
Int J Clin Pharmacol Ther 38, 69-74
- FROMM, M. F. (2004):
Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers.
Trends Pharmacol Sci 25, 423-429
- FRÖSCHER, U. V. (1994):
Epilepsien.
- FUJIKAWA, D. G., H. H. ITABASHI, A. WU u. S. S. SHINMEI (2000a):
Status epilepticus-induced neuronal loss in humans without systemic complications or epilepsy.
Epilepsia 41, 981-991

- FUJIKAWA, D. G., S. S. SHINMEI u. B. CAI (2000b):
Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms.
Epilepsia 41 Suppl 6, S9-13
- GAGE, F. H. (2002):
Neurogenesis in the adult brain.
J Neurosci 22, 612-613
- GAGE, F. H., G. KEMPERMANN, T. D. PALMER, D. A. PETERSON u. J. RAY (1998):
Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus.
J Neurobiol 36, 249-266
- GLIEN, M., C. BRANDT, H. POTSCHKA, H. VOIGT, U. EBERT u. W. LÖSCHER (2001):
Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy.
Epilepsy Res 46, 111-119
- GODDARD, G. V., D. C. MCINTYRE u. C. K. LEECH (1969):
A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.
Exp Neurol 25, 295-330
- GORTER, J. A., E. A. VAN VLIET, E. ARONICA u. F. H. LOPES DA SILVA (2001):
Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons.
Eur J Neurosci 13, 657-669
- GOULD, E. (2007):
How widespread is adult neurogenesis in mammals?
Nat Rev Neurosci. 8, 481-488
- GRAY, W. P. u. L. E. SUNDSTROM (1998):
Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat.
Brain Res 790, 52-59
- GULYAEV, A. E., S. E. GELPERINA, I. N. SKIDAN, A. S. ANTROPOV, G. Y. KIVMAN u. J. KREUTER (1999):
Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles.
Pharm Res 16, 1564-1569
- GUPTA, Y. K., S. BRIYAL u. G. CHAUDHARY (2002):
Protective effect of trans-resveratrol against kainic acid-induced seizures and oxidative stress in rats.
Pharmacol Biochem Behav 71, 245-249

- HALL, H., E. J. WILLIAMS, S. E. MOORE, F. S. WALSH, A. PROCHIANTZ u. P. DOHERTY (1996):
Inhibition of FGF-stimulated phosphatidylinositol hydrolysis and neurite outgrowth by a cell-membrane permeable phosphopeptide.
Curr Biol 6, 580-587
- HALONEN, T., J. NISSINEN u. A. PITKANEN (2001):
Effect of lamotrigine treatment on status epilepticus-induced neuronal damage and memory impairment in rat.
Epilepsy Res 46, 205-223
- HAU, P., K. FABEL, U. BAUMGART, P. RUMMELE, O. GRAUER, A. BOCK, C. DIETMAIER, W. DIETMAIER, J. DIETRICH, C. DUDEL, F. HUBNER, T. JAUCH, E. DRECHSEL, I. KLEITER, C. WISMETH, A. ZELLNER, A. BRAWANSKI, A. STEINBRECHER, J. MARIENHAGEN u. U. BOGDAHN (2004):
Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma.
Cancer 100, 1199-1207
- HAUSER (1999):
Incidence and Prevalence. In: ENGEL, J., und A.T. PEDLEY (Hrsg.):
Epilepsy, The Comprehensive CD-ROM.
Lippincott Williams and Wilkins
- HINSBY, A. M., V. BEREZIN u. E. BOCK (2004):
Molecular mechanisms of NCAM function.
Front Biosci 9, 2227-2244
- HOFFMAN, G. E., N. MOORE, G. FISKUM u. A. Z. MURPHY (2003):
Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment.
Exp Neurol 182, 124-134
- HOKE, A. (2006):
Erythropoietin and the Nervous System.
Springer US
- HONCHAR, M. P., J. W. OLNEY u. W. R. SHERMAN (1983):
Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats.
Science 220, 323-325
- ILLUM, L. (2004):
Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality?
J Pharm Pharmacol 56, 3-17
- JESSBERGER, S., B. ROMER, H. BABU u. G. KEMPERMANN (2005):
Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells.
Exp Neurol 196, 342-351

- JOPE, R. S., R. A. MORRISETT u. O. C. SNEAD (1986):
Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats.
Exp Neurol 91, 471-480
- JULIANO, R. L. u. V. LING (1976):
A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.
Biochim Biophys Acta 455, 152-162
- KARAGIANNIS, T. C. u. A. EL-OSTA (2005):
RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs.
Cancer Gene Ther. 12, 787-795
- KISS, J. Z., E. TRONCOSO, Z. DJEBBARA, L. VUTSKITS u. D. MULLER (2001):
The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair.
Brain Res Brain Res Rev 36, 175-184
- KLEENE, R. u. M. SCHACHNER (2004):
Glycans and neural cell interactions.
Nat Rev Neurosci 5, 195-208
- KLEMENTIEV, B., T. NOVIKOVA, V. NOVITSKAYA, P. S. WALMOD, O. DMYTRIYEVA, B. PAKKENBERG, V. BEREZIN u. E. BOCK (2007):
A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Abeta.
Neuroscience 145, 209-224
- KLEMENTIEV, B., T. NOVIKOVA, I. KORSHUNOVA, V. BEREZIN u. E. BOCK (2008):
The NCAM-derived P2 peptide facilitates recovery of cognitive and motor function and ameliorates neuropathology following traumatic brain injury.
Eur J Neurosci 27, 2885-2896
- KREUTER, J. (2001):
Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs.
Adv Drug Deliv Rev 47, 65-81
- KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2000):
Early identification of refractory epilepsy.
N Engl J Med 342, 314-319
- KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2006):
Refractory epilepsy: mechanisms and solutions.
Expert Rev Neurother 6, 397-406
- LECOUTEUR, R. A. u. G. CHILD (1989):
Clinical management of epilepsy of dogs and cats.
Probl Vet Med 1, 578-595

LEE, S. H. u. P. J. SINKO (2006):
siRNA--getting the message out.
Eur J Pharm Sci 27, 401-410

LEE, G., L. SCHLICHTER, M. BENDAYAN u. R. BENDAYAN (2001):
Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia.
J Pharmacol Exp Ther 299, 204-212

LEPPIK, I. E. (1992):
Intractable epilepsy in adults.
Epilepsy Res Suppl 5, 7-11

LEUNG, R. K. u. P. A. WHITTAKER (2005):
RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics.
Pharmacol Ther 107, 222-239

LEWIS, D. L. u. J. A. WOLFF (2005):
Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by
hydrodynamic intravascular injection.
Methods Enzymol 392, 336-350

LIPSKY, R. H. u. A. M. MARINI (2007):
Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity.
Ann N Y Acad Sci 1122, 130-143

LÖSCHER, W. (1997):
Animal models of intractable epilepsy.
Prog Neurobiol 53, 239-258

LÖSCHER, W. (2003):
Pharmacological basis of the treatment of epilepsy in dogs and cats.
Praktischer Tierarzt 84, 574-586

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2002):
Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs.
J Pharmacol Exp Ther 301, 7-14

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005):
Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters.
Nat Rev Neurosci 6, 591-602

LÖSCHER, W. u. D. SCHMIDT (2002):
New horizons in the development of antiepileptic drugs.
Epilepsy Res 50, 3-16

LOWENSTEIN, D. H., T. BLECK u. R. L. MACDONALD (1999):
It's time to revise the definition of status epilepticus.
Epilepsia 40, 120-122

MACPHEE, G. J., G. T. MCINNES, G. G. THOMPSON u. M. J. BRODIE (1986):
Verapamil potentiates carbamazepine neurotoxicity: a clinically important inhibitory interaction.
Lancet 1, 700-703

MAIESE, K., F. LI u. Z. Z. CHONG (2004):
Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled?
Trends Pharmacol Sci 25, 577-583

MARCHI, N., G. GUIZO, M. RIZZI, S. PIRKER, K. NOVAK, T. CZECH, C. BAUMGARTNER, D. JANIGRO, S. CACCIA u. A. VEZZANI (2005):
A pilot study on brain-to-plasma partition of 10,11-dihydro-10-hydroxy-5H-dibenzo(b,f)azepine-5-carboxamide and MDR1 brain expression in epilepsy patients not responding to oxcarbazepine.
Epilepsia 46, 1613-1619

MARQUES, J. T. u. B. R. WILLIAMS (2005):
Activation of the mammalian immune system by siRNAs.
Nat Biotechnol 23, 1399-1405

MARINI, A. M., X. JIANG, X. WU, F. TIAN, D. ZHU, P. OKAGAKI u. R. H. LIPSKY (2004):
Role of brain-derived neurotrophic factor and NF-kappaB in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype.
Restor Neurol Neurosci 22, 121-130

MARTI, H. H. (2004):
Erythropoietin and the hypoxic brain.
J Exp Biol 207, 3233-3242

MATSUI, Y., N. KOBAYASHI, M. NISHIKAWA u. Y. TAKAKURA (2005):
Sequence-specific suppression of *mdr1a/1b* expression in mice via RNA interference.
Pharm Res 22, 2091-2098

MING, G. L. u. H. SONG (2005):
Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system.
Annu Rev Neurosci 28, 223-250

MOMMA, S., E. VASILYEVA, N. TOMILIN u. O. SHUPLIAKOV (2002):
Ultrastructural identification of dividing cells in the adult mammalian central nervous system.
J Neurosci Methods 119, 59-63

MOSCHOS, S. A., S. W. JONES, M. M. PERRY, A. E. WILLIAMS, J. S. ERJEFALT, J. J. TURNER, P. J. BARNES, B. S. SPROAT, M. J. GAIT u. M. A. LINDSAY (2007):
Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity.
Bioconjug Chem 18, 1450-1459

- NOH, H. S., Y. S. KIM, Y. H. KIM, J. Y. HAN, C. H. PARK, A. K. KANG, H. S. SHIN, S. S. KANG, G. J. CHO u. W. S. CHOI (2006):
Ketogenic diet protects the hippocampus from kainic acid toxicity by inhibiting the dissociation of bad from.
J Neurosci Res 84, 1829-1836
- OLSEN, N. V. (2003):
Central nervous system frontiers for the use of erythropoietin.
Clin Infect Dis 37 Suppl 4, 323-330
- PARDRIDGE, W. M. (2005):
The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development.
NeuroRx 2, 3-14
- PARDRIDGE, W. M., P. L. GOLDEN, Y. S. KANG u. U. BICKEL (1997):
Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein.
J Neurochem 68, 1278-1285
- PARENT, J. M. (2002):
The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair.
Epilepsy Res 50, 179-189
- PARENT, J. M., R. C. ELLIOTT, S. J. PLEASURE, N. M. BARBARO u. D. H. LOWENSTEIN (2006):
Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy.
Ann Neurol 59, 81-91
- PARENT, J. M. u. D. H. LOWENSTEIN (2002):
Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain?
Prog Brain Res 135, 121-131
- PARENT, J. M., S. JANUMPALLI, J. O. MCNAMARA u. D. H. LOWENSTEIN (1998a):
Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat.
Neurosci Lett 247, 9-12
- PARENT, J. M., S. JANUMPALLI, J. O. MCNAMARA u. D. H. LOWENSTEIN (1998b):
Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat.
Neurosci Lett 247, 9-12
- PARENT, J. M., T. W. YU, R. T. LEIBOWITZ, D. H. GESCHWIND, R. S. SLOVITER u. D. H. LOWENSTEIN (1997):
Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus.
J Neurosci 17, 3727-3738

PATEL, V. A., M. J. DUNN u. A. SOROKIN (2002):
Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2.
J Biol Chem 277, 38915-38920

PAXINOS, G. u. C. WATSON (2005):
The rat brain in stereotactic coordinates.
Academic Press, Sydney

PEI, Y. u. T. TUSCHL (2006):
On the art of identifying effective and specific siRNAs.
Nat Methods 3, 670-676

PEKCEC, A., C. FUEST, M. MUHLENHOFF, R. GERARDY-SCHAHN u.
H. POTSCHKA (2008):
Targeting epileptogenesis-associated induction of neurogenesis by enzymatic
depolyialylation of NCAM counteracts spatial learning dysfunction but fails to impact
epilepsy development.
J Neurochem 105, 389-400

PEKCEC, A., M. MUHLENHOFF, R. GERARDY-SCHAHN u. H. POTSCHKA (2007):
Impact of the PSA-NCAM system on pathophysiology in a chronic rodent model of
temporal lobe epilepsy.
Neurobiol Dis 27, 54-66

PEKCEC, A. u. H. POTSCHKA (2007):
Newborn neurons with hilar basal dendrites hallmark epileptogenic networks.
Neuroreport 18, 585-589

PILLAI, A., K. M. DHANDAPANI, B. A. PILLAI, A. V. TERRY, JR. u. S. P. MAHADIK
(2008):
Erythropoietin prevents haloperidol treatment-induced neuronal apoptosis through
regulation of BDNF.
Neuropsychopharmacology 33, 1942-1951

PITKANEN, A. (2002):
Efficacy of current antiepileptics to prevent neurodegeneration in epilepsy models.
Epilepsy Res 50, 141-160

PITKANEN, A. u. T. P. SUTULA (2002):
Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in
temporal-lobe epilepsy.
Lancet Neurol 1, 173-181

PODELL, M., W. R. FENNER u. J. D. POWERS (1995):
Seizure classification in dogs from a nonreferral-based population.
J Am Vet Med Assoc 206, 1721-1728

POTSCHKA, H., M. FEDROWITZ u. W. LÖSCHER (2001):

P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain.

Neuroreport 12, 3557-3560

POTSCHKA, H., M. FEDROWITZ u. W. LÖSCHER (2002):

P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats.

Neurosci Lett 327, 173-176

POTSCHKA, H. u. W. LÖSCHER (2001):

In vivo evidence for P-glycoprotein-mediated transport of phenytoin at the blood-brain barrier of rats.

Epilepsia 42, 1231-1240

POTSCHKA, H., H. A. VOLK u. W. LÖSCHER (2004):

Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats.

Neuroreport 15, 1657-1661

POVLSEN, G. K., D. K. DITLEVSEN, V. BEREZIN u. E. BOCK (2003):

Intracellular signaling by the neural cell adhesion molecule.

Neurochem Res 28, 127-141

RACINE, R. J. (1975):

Modification of seizure activity by electrical stimulation: cortical areas.

Electroencephalogr Clin Neurophysiol 38, 1-12

RANSOME, M. I. u. A. M. TURNLEY (2007):

Systemically delivered Erythropoietin transiently enhances adult hippocampal neurogenesis.

J Neurochem 102, 1953-1965

RAO, M. S. u. A. K. SHETTY (2004):

Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus.

Eur J Neurosci. 19, 234-246

REGESTA, G. u. P. TANGANELLI (1999):

Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies.

Epilepsy Res. 34, 109-122

RIEUX, C., R. CARNEY, D. LUPI, O. DKHISSI-BENYAHYA, K. JANSEN, N. CHOUNLAMOUNTRI, R. G. FOSTER u. H. M. COOPER (2002):

Analysis of immunohistochemical label of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus: comparison of different methods of quantification.

J Biol Rhythms 17, 121-136

RIZZI, M., S. CACCIA, G. GUIZO, C. RICHICHI, J. A. GORTER, E. ARONICA, M. ALIPRANDI, R. BAGNATI, R. FANELLI, M. D'INCALCI, R. SAMANIN u. A. VEZZANI (2002):

Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance.

J Neurosci 22, 5833-5839

SADAMOTO, Y., K. IGASE, M. SAKANAKA, K. SATO, H. OTSUKA, S. SAKAKI, S. MASUDA u. R. SASAKI (1998):

Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery.

Biochem Biophys Res Commun 253, 26-32

SALMENPERA, T., R. KALVIAINEN, K. PARTANEN u. A. PITKANEN (2001):

Hippocampal and amygdaloid damage in partial epilepsy: a cross-sectional MRI study of 241 patients.

Epilepsy Res 46, 69-82

SCHARFMAN, H. E. u. R. HEN (2007):

Neuroscience. Is more neurogenesis always better?

Science 315, 336-338

SCHARFMAN, H. E., A. E. SOLLAS, R. E. BERGER, J. H. GOODMAN u. J. P. PIERCE (2003):

Perforant path activation of ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures.

Neuroscience 121, 1017-1029

SCHINKEL, A. H. (1999):

P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier.

Adv Drug Deliv Rev 36, 179-194

SCHWARTZ-PORSCHKE, D. u. U. JURGENS (1991):

Effectiveness of bromide in therapy resistant epilepsy of dogs.

Tierarztl Prax 19, 395-401

SCOTT, B. W., S. WANG, W. M. BURNHAM, B. U. DE u. J. M. WOJTOWICZ (1998):

Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat.

Neurosci Lett 248, 73-76

SEIDENFADEN, R., A. KRAUTER u. H. HILDEBRANDT (2006):

The neural cell adhesion molecule NCAM regulates neuritogenesis by multiple mechanisms of interaction.

Neurochem Int 49, 1-11

SHANG, Y., Y. WU, S. YAO, X. WANG, D. FENG u. W. YANG (2007):

Protective effect of erythropoietin against ketamine-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons: involvement of PI3K/Akt and GSK-3 beta pathway.

Apoptosis 12, 2187-2195

- SHAPIRO, L. A., M. J. KORN u. C. E. RIBAK (2005):
Newly generated dentate granule cells from epileptic rats exhibit elongated hilar basal dendrites that align along GFAP-immunolabeled processes.
Neuroscience 136, 823-831
- SHAPIRO, L. A., S. FIGUEROA-ARAGON u. C. E. RIBAK (2007):
Newly generated granule cells show rapid neuroplastic changes in the adult rat dentate gyrus during the first five days following pilocarpine-induced seizures.
Eur J Neurosci 26, 583-592
- SHAPIRO, L. A. u. C. E. RIBAK (2006):
Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses.
Epilepsy Res 69, 53-66
- SHIN, H. J., J. Y. LEE, E. SON, D. H. LEE, H. J. KIM, S. S. KANG, G. J. CHO, W. S. CHOI u. G. S. ROH (2007):
Curcumin attenuates the kainic acid-induced hippocampal cell death in the mice.
Neurosci Lett 416, 49-54
- SHINGO, T., S. T. SOROKAN, T. SHIMAZAKI u. S. WEISS (2001):
Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells.
J Neurosci 21, 9733-9743
- SILLS, G. J., P. KWAN, E. BUTLER, E. C. DE LANGE, D. J. VAN DEN BERG u. M. J. BRODIE (2002):
P-glycoprotein-mediated efflux of antiepileptic drugs: preliminary studies in mdr1a knockout mice.
Epilepsy Behav 3, 427-432
- SIMONATO, M., E. TONGIORGI u. M. KOKAIA (2006):
Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy.
Trends Pharmacol Sci 27, 631-638
- SISODIYA, S. M., W. R. LIN, B. N. HARDING, M. V. SQUIER u. M. THOM (2002):
Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy.
Brain 125, 22-31
- SKIBO, G. G., I. V. LUSHNIKOVA, K. Y. VORONIN, O. DMITRIEVA, T. NOVIKOVA, B. KLEMENTIEV, E. VAUDANO, V. A. BEREZIN u. E. BOCK (2005):
A synthetic NCAM-derived peptide, FGL, protects hippocampal neurons from ischemic insult both in vitro and in vivo.
Eur J Neurosci 22, 1589-1596
- SLOVITER, R. S. (1999):
Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization.
Epilepsia 40 Suppl 1, S34-39

SLOVITER, R. S. (2005):

The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge.

C R Biol 328, 143-153

SLOVITER, R. S., E. DEAN, A. L. SOLLAS u. J. H. GOODMAN (1996):

Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat.

J Comp Neurol 366, 516-533

SONMEZ, A., B. KABAKCI, E. VARDAR, D. GUREL, U. SONMEZ, Y. T. ORHAN, U. ACIKEL u. N. GOKMEN (2007):

Erythropoietin attenuates neuronal injury and potentiates the expression of pCREB in anterior horn after transient spinal cord ischemia in rats.

Surg Neurol 68, 297-303

SONN, K., S. PANKRATOVA, A. ZHARKOVSKY, E. BOCK u. V. BEREZIN (2007):

An erythropoietin-derived synthetic peptide, epotris, inhibits kainic acid-induced seizures.

J Neurochem 101, 21-68

SPECTOR, S., C. CULL u. L. H. GOLDSTEIN (2000):

Seizure precipitants and perceived self-control of seizures in adults with poorly-controlled epilepsy.

Epilepsy Res 38, 207-216

SPERK, G. (2006):

Mesiale Temporallappenepilepsie: Morphologische und neurochemische Plastizität des Hippocampus.

Neuroforum 1, 144-151

SPUDICH, A., E. KILIC, H. XING, U. KILIC, K. M. RENTSCH,

H. WUNDERLI-AlLENSPACH, C. L. BASSETTI u. D. M. HERMANN (2006):

Inhibition of multidrug resistance transporter-1 facilitates neuroprotective therapies after focal cerebral ischemia.

Nat Neurosci 9, 487-488

STEGE, A., A. PRIEBSCH, C. NIETH u. H. LAGE (2004):

Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference.

Cancer Gene Ther 11, 699-706

STEWART, L. S., L. S. LEUNG u. M. A. PERSINGER (2001):

Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity.

Epilepsy Res 44, 207-212

SUMMERS, M. A., J. L. MOORE u. J. W. MCAULEY (2004):

Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy.

Ann Pharmacother 38, 1631-1634

- TAN, P. H., L. C. YANG, H. C. SHIH, K. C. LAN u. J. T. CHENG (2005):
Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat.
Gene Ther 12, 59-66
- TISHLER, D. M., K. I. WEINBERG, D. R. HINTON, N. BARBARO, G. M. ANNETT u. C. RAFFEL (1995):
MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy.
Epilepsia 36, 1-6
- TURSKI, W. A., E. A. CAVALHEIRO, M. SCHWARZ, S. J. CZUCZWAR, Z. KLEINROK u. L. TURSKI (1983):
Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study.
Behav Brain Res 9, 315-335
- UPRICHARD, S. L. (2005):
The therapeutic potential of RNA interference.
FEBS Lett 579, 5996-6007
- VELISEK, L. u. S. L. MOSHE (2003):
Temporal lobe epileptogenesis and epilepsy in the developing brain: bridging the gap between the laboratory and the clinic. Progression, but in what direction?
Epilepsia 44 Suppl 12, 51-59
- VELISKOVA, J., L. VELISEK, A. S. GALANOPOULOU u. E. F. SPERBER (2000):
Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus.
Epilepsia 41 Suppl 6, S30-35
- VIANNA, E. P., A. T. FERREIRA, F. DONA, E. A. CAVALHEIRO u. M. J. DA SILVA FERNANDES (2005):
Modulation of seizures and synaptic plasticity by adenosinergic receptors in an experimental model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in rats.
Epilepsia 46 Suppl 5, 166-173
- VIVIANI, B., S. BARTESAGHI, E. CORSINI, P. VILLA, P. GHEZZI, A. GARAU, C. L. GALLI u. M. MARINOVICH (2005):
Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor.
J Neurochem 93, 412-421
- VOLK, H., H. POTSCHKA u. W. LÖSCHER (2004):
Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats.
Epilepsy Res. 58, 67-79
- VOLK, H., H. POTSCHKA u. W. LÖSCHER (2005):
Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables.
J Histochem Cytochem 53, 517-531

VOLLMANN-HONSDORF, G. (2001):

Lichtmikroskopische und ultrastrukturelle morphologische Veränderungen in der Hippocampusformation von *Tupaia* (*Tupaia belangeri*) als Folge von chronisch psychosozialem Streß.

VON CAMPE, G., D. D. SPENCER u. N. C. DE LANEROLLE (1997):

Morphology of dentate granule cells in the human epileptogenic hippocampus. *Hippocampus* 7, 472-488

VOUTSINOS-PORCHE, B., E. KONING, H. KAPLAN, A. FERRANDON, M. GUENOUNOU, A. NEHLIG u. J. MOTTE (2004):

Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 17, 385-402

VUTSKITS, L., Z. DJEBBARA-HANNAS, H. ZHANG, J. P. PACCAUD, P. DURBEC, G. ROUGON, D. MULLER u. J. Z. KISS (2001):

PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur J Neurosci* 13, 1391-1402

WALMOD, P. S., K. KOLKOVA, V. BEREZIN u. E. BOCK (2004):

Zipper make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res* 29, 2015-2035

WANG, Q., S. YU, A. SIMONYI, G. ROTTINGHAUS, G. Y. SUN u. A. Y. SUN (2004):

Resveratrol protects against neurotoxicity induced by kainic acid. *Neurochem Res* 29, 2105-2112

WEST, M. J., L. SLOMIANKA u. H. J. GUNDERSEN (1991):

Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231, 482-497

WU, Y., Y. SHANG, S. G. SUN, R. G. LIU u. W. Q. YANG (2007):

Protective effect of erythropoietin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurodegeneration in PC12 cells. *Neurosci Bull* 23, 156-164

YANG, J., Y. HUANG, X. YU, H. SUN, Y. LI u. Y. DENG (2007):

Erythropoietin preconditioning suppresses neuronal death following status epilepticus in rats. *Acta Neurobiol Exp* 67, 141-148

YILMAZER-HANKE, D. M., H. K. WOLF, J. SCHRAMM, C. E. ELGER, O. D. WIESTLER u. I. BLUMCKE (2000):

Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 907-920

ZIMMERMANN, T. S., A. C. LEE, A. AKINC, B. BRAMLAGE, D. BUMCROT, M. N. FEDORUK, J. HARBORTH, J. A. HEYES, L. B. JEFFS, M. JOHN, A. D. JUDGE, K. LAM, K. MCCLINTOCK, L. V. NECHEV, L. R. PALMER, T. RACIE, I. ROHL, S. SEIFFERT, S. SHANMUGAM, V. SOOD, J. SOUTSCHEK, I. TOUDJARSKA, A. J. WHEAT, E. YAWORSKI, W. ZEDALIS, V. KOTELIANSKY, M. MANOHARAN, H. P. VORNLOCHER u. I. MACLACHLAN (2006):

RNAi-mediated gene silencing in non-human primates.

Nature 441, 111-114

ZHANG, F., A. P. SIGMORE, Z. ZHOU, S. WANG, G. CAO u. J. CHEN (2006):

Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: potential signaling mechanisms.

J Neurosci Res 83, 1241-1251

ZHANG, W., H. YANG, X. KONG, S. MOHAPATRA, H. SAN JUAN-VERGARA, G. HELLERMANN, S. BEHERA, R. SINGAM, R. F. LOCKEY u. S. S. MOHAPATRA (2005):

Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene.

Nat Med 11, 56-62

10 ANHANG

10.1 GERÄTE

Geräte für die Stimulation der BLA

Geräte	Typ-Bezeichnung	Bezugsquelle
Stereotaktische Apparate	-	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Dentalbohrer		Fa. Karl Fischer, Pforzheim
Stimulatoreinheiten	Battery charger, Accupulser A310C, Stimulus Isolator A365	World Precision Instruments, Berlin
Personal Computer	Intel Pentium-IV Prozessor mit 1000 MHz, 256 MB Arbeitsspeicher, 40 GB SCSI- Festplatte und Betriebssystem Windows XP und typ-verwandte Geräte	Diverse Bezugsquellen
Stimulations- und EEG-Kabel	Kabelentwirler einschließlich: Anschlusskabel / Westernbuchse Dreipoliges, abgeschirmtes, ummanteltes Kabel BNC-Stecker Krokodilklemmen Binder-Stecker	Conrad Elektronik, München
EEG-Software	Chart 5	AD-Instruments, Spechbach
EEG-Ableitung	Powerlab 8/30, Animal Bio Amplifier	AD-Instruments, Spechbach
Beobachtungskäfige		Domes Aquaristik, München

Weitere Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Bildanalysesoftware: KS 400 (Windows Release 3.0, Carl Zeiss Vision) und AxioVision Release 4.6 Stereo Investigator	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen MicroBrightField Europe, Magdeburg
Cryostat (HM560M)	Microm, Walldorf
Objektträger: Histobond® SuperFrost Plus®	Paula Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauder-Königshofen Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
OD-Standard (Calibration of Step Tablet)	Eastman Kodak Company, USA

10.2 LÖSUNGEN UND SUBSTANZEN**Protokolle für die histologischen Methoden****0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung)**

- in Aqua dest.
- 5,7% Na_2HPO_4
- 1,2% NaH_2PO_4
- mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

0,01 M phosphatgepufferte 0,9%ige Kochsalzlösung

- 0,9% NaCl
- 0,01 M Phosphatpuffer
- mit HCl auf pH 7,6 einstellen

4% Paraformaldehyd

- 8% Paraformaldehyd in Aqua dest. auf 60 – 70 °C erhitzen abkühlen lassen
- mit 1 M NaOH Lösung klären
- filtrieren
- mit 0,2 M Phosphatpuffer auf 4%ige Lösung verdünnen

0,05 M Tris gepufferte Saline (TBS)

- 0,9% NaCl
- 0,05 M Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
- mit HCl auf pH 7,6 einstellen

TRIS-Nickel-Lösung

- in 0,05 M TBS
- 0,6% Ammonium-Nickelsulfat
- mit 1 M NaOH auf pH 7,6 einstellen

DAB-Lösung

- Ansatz (entspricht 3,3 mg 3,3'-DAB)
- 4 ml Tris/Ni-Lösung

Carrier-Lösung

- in TBS
- 1% Normalserum (Kaninchen, Schwein, Esel, Ziege)
- 1 % Rinderserumalbumin
- 0,3 % Triton X

Blocking-Lösung

- in *Carrier*-solution
- 11% Normalserum (Kaninchen, Schwein, Esel, Ziege)
- 2% BSA

Gefriermedium

- 4,28 g Glukose
- 0,07 MgCl-Hexahydrat in 25 ml 0,1 M PBS lösen
- ad 50 ml Glycerin

Thionin (Färbelösung)

- 100 ml 1M Essigsäure + 36 ml 1M NaOH
- auf 1L mit Aqua dest. auffüllen
- auf 60 – 70 °C erhitzen
- darin 1,25 g Thionin lösen
- 1h auf dem Magnetrührer rühren
- anschließend heiß filtrieren

Chrom-Gelantine-Lösung

- 0,7 g Gelantine + 0,07 g Chrom III
- mit 100 ml Aqua dest. vermischen
- langsam auf 60 °C hochheizen, bis sich Gelantine gelöst hat
- langsam abkühlen lassen
- eine Messerspitze Tymol dazu geben

Thionin-Färbung

- 3 min in 100% Alkohol
- 3 min in 95% Alkohol
- 3 min in 70% Alkohol
- 3 min in 100% Alkohol
- 3 min in Aqua dest.
- 75 – 95 sek in Thionin
- 3 min in 50% Alkohol
- 3 min in 70% Alkohol
- 3 min in 95% Alkohol
- 3 min in 100% Alkohol
- 3 min in Terpeneol/Xylol-Ersatzmedium 1:1
- 3 min in Xylol-Ersatzmedium
- 3 min in frisches Xylol-Ersatzmedium
- mit Entellan eindecken

Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Aceton	Roth, Karlsruhe
Ammonium Nickel Sulfat Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloralhydrat	E. Merck AG, Darmstadt
Chloramphenicol Succinate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chrom III-Kaliumsulfat Dodecahydrat	Roth, Karlsruhe
3,3 Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Diazepam (Diazepam-ratiopharm®)	Heiland, Hamburg
Einbettmedium (Tissue Freezing Medium)	Jung, Nussloch
Entellan-Eindeckmittel	E. Merck AG, Darmstadt
Essigsäure 99,8%	Roth, Karlsruhe
Ethacridinlactat (Rivanol®)	WDT, Garbsen
Ethanol 99,8%	Roth, Karlsruhe
Ethanol 95% vergällt	Brandwein-Monopolstelle, München
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine, gepulvert	E. Merck AG, Darmstadt
Gentamicin (Friseo-Gent®)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Gentamycinsulfat	WDT, Garbsen
Kunststoff, Kaltpolymerisat (Paladur®)	Pluradent AG, München
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Methylscopolaminbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natrium-Chlorid-Lösung (isoton)	Heiland, Hamburg
Paraformaldehyd	Riedel de Häen, Hannover
Pilocarpinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Serum (Ziege, Schwein, Kaninchen)	DAKO, Denmark
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	DAKO, Denmark
Thionin (Acetate Salt)	Roth, Karlsruhe
Toluol	Roth, Karlsruhe
Tris[hydroxymethyl]-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton x – 100	Applichem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Applichem, Darmstadt
Xylol-Ersatz-Medium (Rotihistol®)	Roth, Karlsruhe

PUBLIKATIONEN

Veröffentlichungen in internationalen Zeitungen

Pekcec A, **Fuest C**, Muhlenhoff M, Gerardy-Schahn R and H Potschka (2008):
Targeting epileptogenesis-associated induction of neurogenesis by NCAM-modification counteracts spatial learning dysfunction but fails to impact epilepsy development.

Journal of Neurochemistry, 105 Issue 2: 389-400

Fuest C, Bankstahl M, Winter P, Helm M, Pekcec A and H Potschka:
In vivo down-regulation of mouse brain capillary P-glycoprotein
submitted to the **European Journal of Pharmaceutical Sciences**

Unkrüer B, Pekcec A, **Fuest C**, Wehmeyer A, Balda M, Horn A, Baumgärtner W and H Potschka:

Cellular localization of Y-box binding protein 1 in brain tissue of rats, macaques, and humans.

Manuskript in Vorbereitung

Zitierfähige Kongressbeiträge

Pekcec A, **Fuest C**, Stummeyer K, Muhlenhoff M, Gerardy-Schahn R and H Potschka (2006):

Modulation of neuronal plasticity affects status epilepticus and epileptogenesis in a rat model.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 372: 83-83 303.

Fuest C, Pekcec A, Bock E, Berezin V.A. and H Potschka:

Impact of NCAM- and erythropoietin-derived peptides on neurogenesis in a status epilepticus model

Abstract book, Poster No 8

Adult Neurogenesis Meeting, Dresden, October 2007

Pekcec A, **Fuest C**, Muhlenhoff M, Gerardy-Schahn R and H Potschka:

Targeting Epileptogenesis-associated induction of neurogenesis by NCAM-modification counteracts spatial learning dysfunction but fails to impact epilepsy development

Abstract book, Poster No 30

Adult Neurogenesis Meeting, Dresden, October 2007

Fuest C, Pekcec A, Bock E, Berezin V.A. and H Potschka:
Impact of the NCAM-derived peptide *Plannexin* on neurogenesis in a
status epilepticus model.

Abstract book, Poster No T 160

8th European Congress on Epileptology, Berlin, September 2008

Winter P, **Fuest C**, Czapp M, Uhr M, MacLean C, Helm M, Fricker G, Pekcec A and
H Potschka:

Modulation of P-glycoprotein expression by RNA interference *in vivo*.

Abstract book, Poster No T 161

8th European Congress on Epileptology, Berlin, September 2008

Sonstige Beiträge

Fuest C, Pekcec A, Bock E, Berezin V.A. and H Potschka

Effect of NCAM and erythropoietin mimetic peptides on neurodegeneration and
neurogenesis in status epilepticus models.

Programmheft 2008, Programm No 13

Vetpharm-Symposium, Gießen

DANKSAGUNG

Meinen größten Dank möchte ich meiner Mentorin Frau Prof. Dr. H. Potschka aussprechen für die Überlassung des Themas, die jederzeitige ideenreiche, wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft, die Anleitung zur experimentellen pharmakologischen und neurowissenschaftlichen Forschung und zur Abfassung dieser Dissertation. Zudem bedanke ich mich für die vorbehaltlose Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die uneingeschränkte Hilfestellung in allen Labor- und Lebenslagen, die Motivation, dem mir entgegengebrachten Vertrauen sowie die mir jederzeit gewährte konstruktive Unterstützung und Förderung meines beruflichen Werdeganges. Meinen größten Respekt möchte ich ihr an dieser Stelle aussprechen für den Aufbau einer einmaligen Arbeitsatmosphäre und Teamgemeinschaft und für ihr aktives unermüdliches Zutun zur Erhaltung dieser.

Anton Pekcec danke ich für die stimulierende Einführung in die neurowissenschaftliche Forschung und Immunhistologie, die weit über das übliche Maß hinausgehende kompetente Betreuung während meiner Dissertationsarbeit, die niemals enden wollende konstruktive kritische Begutachtung jegliches meines Tuns, die interessanten und lehrreichen Diskussionen und Ideen und die helfende Hand zu jeder Tages- und Nachtzeit. Vor allem aber möchte ich mich bedanken für seine Freundschaft, die Erweiterung meines kulinarischen Horizontes, die gemeinsamen Erlebnisse und seinen großen Beitrag zu meinem persönlichen *enriched environment*.

Petra Winter danke ich für die Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung experimenteller und schriftlicher Arbeiten, ihre permanente Hilfsbereitschaft, ihr stetig offenes Ohr für meine kleinen und großen Probleme, besonders aber für ihre Freundschaft, ihren ansteckenden Optimismus, ihre unermüdliche Aufmunterung und die wunderbare gemeinsame Zeit in München.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Bock und Herrn Dr. Vladimir Berezin danke ich für die Bereitstellung der mimetischen Peptide und die gute Kooperation bei den Untersuchungen zur Modulation anfallsinduzierter neuronaler Veränderungen durch mimetische Peptide.

Herrn Dr. Uhr und Frau Sangl danke ich für die Durchführung der Versuche zur Quantifizierung der Pgp-Expression.

Darüber hinaus danke ich meinem einmaligen „Mitdoktoranden-dreamteam“ Bernadette und Guido für die nette gemeinsame Zeit im Labor, für die stetige Hilfsbereitschaft, die moralische Unterstützung, die wunderbare Zusammenarbeit, ihre Toleranz gegenüber (fast) jeglicher meiner Eigenarten und vor allem für den Sonnenschein auch an regnerischen und trüben Tagen.

Jonna Sørensen danke ich für ihr engagiertes Zutun zu einer tollen Arbeitsatmosphäre und besonders für ihr schallendes, ansteckendes Lachen und die amüsanten gemeinsamen Unternehmungen. Juli Schlichtiger danke ich für die netten gemeinsamen Stunden im Institut. Hero Bartmann danke ich für die medizinischen Ratschläge, die spaßigen Aufmunterungen und vor allem für seine Nachhilfestunden zum Thema „Was denkt Mann, was meint Mann“.

Für die tägliche freundliche und kompetente Unterstützung möchte ich mich bedanken bei Heidi Zankl, Andrea Wehmeyer, Marion Fisch und Carmen Meyer.

Alex Liebshtein von der Firma Carl Zeiss danke ich für seine anregenden Gespräche und experimentierfreudigen Beiträge in denen er versucht hat, mir die Tiefen der AxioVision und KS400 Software näher zu bringen.

Herrn Richard Frank danke ich für die Pflege der Versuchstiere.

Ich danke der FAZit-Stiftung und der Bayer HealthCare AG für die finanzielle Unterstützung, die die Erstellung dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

Meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren begleitet haben gilt mein großer Dank für ihre Geduld und ihre Unterstützung in jeglicher Form besonders aber für den steten Glauben an mich und meine Fähigkeiten, der mich durch so einige Tiefpunkte hindurch gelotst hat. Vor allem bedanke ich mich bei Britta für die mentale Unterstützung in guten und schwierigen Zeiten und für so manche therapeutische Sitzung in besonders schweren Fällen ☺. Insbesondere aber möchte ich ihr danken für ihre unbeschreibbare und unersetzbare Freundschaft.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinen Brüdern Matthias und Alexander danke ich für ihre Liebe, ihre Rückenstärkung, ihr Vertrauen, ihre Geduld und ihre Akzeptanz und Unterstützung aller meiner persönlichen Entscheidungen. Ohne sie wäre die Erstellung und Verfassung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Schließlich danke ich Franz für sein großes Interesse an meiner Forschung, sein offenes Ohr bei allen Schwierigkeiten, seine ausdauernde Bereitschaft für fachliche Diskussionen sowie seine oft daraus hervorgehenden trivialen Problemlösungen besonders aber für seine liebevolle Unterstützung und die entspannten, kraftgebenden gemeinsamen Stunden beim Endspurt zu dieser Dissertation. DANKE, paast scho.